IDENTIFIZIERUNG VON BINDEPROTEINEN IN DER PLASTOCHINON-REGION DER THYLAOIDMEMBRAN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

UDO JOHANNINGMEIER

aus Gladbeck

Bochum 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0010

IDENTIFIZIERUNG VON BINDEPROTEINEN IN DER PLASTOCHINON-REGION DER THYLAOIDMEMBRAN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

UDO JOHANNINGMEIER

aus Gladbeck

Bochum 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. A. Trebst

Koreferent: Prof. Dr. W. Hengstenberg

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG 1

ERGEBNISSE

1. Die Analyse von Proteinen der Thylakoidmembran 7

2. Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) 11

1. DCCD als Hemmstoff des entkoppelten Elektronentransportes 11

2. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.1. 17

3.1. ^{14}C-DCCD-markierte Polypeptide der Thylakoidmembran 19

3.2. Einfluß von DCCD auf den entkoppelten Elektronentransport in Thylakoiden von Gerstenmutanten 22

3.3. Einfluß von Rinderserumalbumin auf den durch DCCD gehemmten Elektronentransport 26

4. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.3. 30

3. Identifizierung eines Proteinanteils im Bereich der Plastochinon-Reduktion mit Hilfe eines radioaktiv markierten Arylazids 32

1. Photolabel als Mittel zur Identifizierung von Polypeptiden der Thylakoidmembran 32

2. ^{3}H-DNSA-markierte Polypeptide der Thylakoidmembran 35

3. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 3. 39

4. Einfluß verschiedener Hemmstoffe der Plastochinon-Reduktion auf teilweise gereinigte Photosystem II-Partikel 43

1. Hemmstoffempfindlichkeit von Photosystem II-Partikeln 43

2. Einfluß von Trypsin auf die Hemmstoffempfindlichkeit von Photosystem II-Partikeln 49

3. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 4. 53

DISKUSSION 57

ZUSAMMENFASSUNG 64

MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien 67

2. Chloroplastenpräparation 67

3. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes 68

4. Bestimmung der photosynthetischen Aktivität 69

5. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) 69

6. Präparation von Digitonin-PS II-Partikeln 73

7. Radioaktive Markierung der Thylakoidproteine mit dem Photolabel ^{3}H-DNSA 74

LITERATURVERZEICHNIS 75

ABKÜRZUNGEN

Asc	Na-Ascorbat
Cyt	Cytochrom
Chl	Chlorophyll
cpm	counts per minute
DAD	Diaminodurol (2,3,5,6-Tetramethyl-p-phenylendiamin)
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DBMIB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon
DCIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol
DCMU	3(3',4'-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DNSA	4-Nitro-2-azido-6-isobutylphenol
DMMDBQ	Dimethylmethylendioxo-p-benzochinon
DNP-INT	2,4-Dinitrophenylether von Jodnitrothymol
DPC	Diphenylcarbazid
DQH_2	Durohydrochinon (Tetramethyl-p-benzochinon)
Fd	Ferredoxin
Fecy	$K_3Fe(III)CN_6$
kD	kilodalton
Mv	Methylviologen
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
OD	Optische Dichte
PS	Photosystem
PQ	Plastochinon
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PD	Phenylendiamin
Pcy	Plastocyanin
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin

EINLEITUNG

In der photosynthetischen Lichtreaktion höherer Pflanzen und Algen werden gegen das thermodynamische Gefälle Elektronen vom Wasser auf NADP übertragen. Als Folge dieser multienzymatischen, an das innere Membransystem von Chloroplasten gekoppelten Redoxreaktion wird aus ADP und P_a ATP gebildet, das neben reduziertem Pyridinnukleotid für die CO_2-Assimilation benötigt wird. Die Verknüpfung zwischen Elektronentransport und Bildung chemischer Energie in Form von ATP blieb lange Zeit unklar, da ein Mechanismus ähnlich dem der Substratkettenphosphorylierung in der Glykolyse nicht nachgewiesen werden konnte. Die heute am besten unterstützte Vorstellung vom Mechanismus der Elektronentransportphosphorylierung, sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien, basiert auf der von Mitchell (1961) vorgeschlagenen chemiosmotischen Theorie, nach der ein gerichteter Elektronenfluß Protonen in ein membranumschlossenes Kompartiment "pumpt". Die resultierende Protonenpotentialdifferenz ist die treibende Kraft für die Phosphorylierungsreaktion.

Ein solches ATP-synthetisierendes Elektronentransportsystem ist der Thylakoid in den Chloroplasten höherer Pflanzen. Die je zur Hälfte aus Protein und Lipiden bestehende, protonenundurchlässige Membran umschließt einen Raum, dessen pH-Wert im Licht erniedrigt wird. Die membrangebundene ATP-Synthetase nutzt den entstandenen pH-Gradienten zur Umwandlung dieser Energieform in ATP.

Für das Verständnis der lichtabhängigen Reaktionen ist die Organisation des Elektronentransportsystems von großer Bedeutung, das

heißt die Kenntnis über Art und Anzahl von Redoxkomponenten, deren Anordnung zueinander, räumliche Lage in der Membran und Assoziation der Komponenten mit Proteinen und/ oder Lipiden. Über Art und Anzahl der Elektronencarrier und deren Anordnung zueinander sind seit dem 1960 von Hill und Bendall eingeführten "Z-Schema" des photosynthetischen Elektronentransportsystems mit zwei Lichtreaktionen beträchtliche Fortschritte erzielt worden.

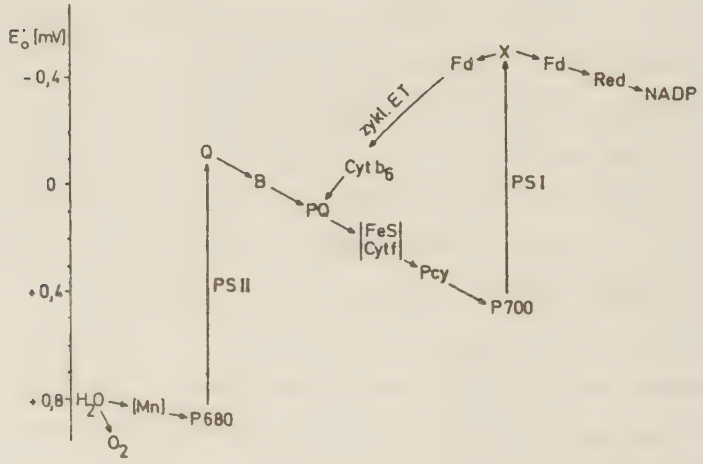


Abb.1: Schema des photosynthetischen Elektronentransportes in einem Redoxpotentialdiagramm. Die bei der Wasserspaltung freiwerdenden Elektronen werden durch zwei Photosysteme (PSII und PSI) auf NADP übertragen. Neben diesem offenkettigen existiert noch ein zyklischer Elektronentransport (zykl.ET), der von PSI abhängig ist und keine Reduktionsäquivalente liefert.

Mn: Mn-haltiger, wasserspaltender Komplex; P680, P700: Reaktionszentrum von PSII bzw. PSI; Q, X: primäre Akzeptoren von PSII bzw. PSI; B: sekundärer Akzeptor von PSII; PQ: Plastochinon-pool; FeS: Eisen-Schwefel-Protein; Cytf, b_6: Cytochrom f bzw. b_{563}; Pcy: Plastocyanin; Fd: Ferredoxin; [illegible]

Eine Reihe von Redoxkomponenten fehlte in ihrem Bild, denn einige Carrier wie Plastochinon und das "Rieske"-FeS-Zentrum waren noch nicht einmal bekannt. Abbildung 1 zeigt, wie man sich das Z-Schema heute vorstellt. Die Komponenten der Redoxkette sind vertikal an einer Redoxskala orientiert und horizontal dem Weg der Elektronen entsprechend angeordnet. Neben dem offenkettigen Elektronenfluß vom Wasser über Photosystem II und Photosystem I zum NADP dient in vivo noch ein zyklischer Elektronentransport mit Beteiligung von Photosystem I, Ferredoxin, Cytochrom b_6 und Plastochinon zur zusätzlichen Bereitstellung von ATP. Details eines Mechanismus, der die Interaktion von Cytochrom b_6 mit Plastochinon im Cytochrom f/b_6-Komplex etwa entsprechend einem Q-Zyklus beschreibt, sind im Schema nicht angeführt. Ebenfalls nicht angedeutet sind die Energiekonservierungsstellen, also die Bereiche, in denen Redoxkomponenten neben Elektronen auch Protonen vektoriell über die Membran transportieren. Die Protonenpotentialdifferenz wird erzeugt durch Oxidation des Wassers auf der Innenseite der Thylakoidmembran (Trebst und Reimer, 1973) und durch den Reduktions/Oxidations-Zyklus des Plastochinons, bei dem H^+-Ionen von außen ins Innere des Thylakoidlumens geschafft werden (Avron und Chance, 1966; Reinwald et al, 1968; Böhme und Cramer, 1972).

Während viele, wenn nicht alle Redoxcarrier heute bekannt sind, so weiß man noch zu wenig über die Topologie der Thylakoidmembran. Elektronenmikroskopische Studien, der Einsatz von chemischen Sonden und Antikörpern haben geholfen, die Anordnung einer Reihe von Komponenten in der Membran - wenn auch nicht in allen Fällen widerspruchsfrei - aufzuklären. Ein anderer, eben-

falls die Topologie der Membran betreffender Aspekt ist die Frage nach dem Proteinteil der Redoxcarrier. In jüngster Zeit ist dieses Gebiet Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. So konnte z.B. das Mn-haltige Protein der Wasserspaltung isoliert werden (Spector und Winget, 1980), ebenso der PSII Pigment-Protein-Komplex (Satoh, 1979), der Cyt f/b_6-Komplex (Hurt und Hauska, 1980) und Komponenten des PSI Pigment-Protein-Komplexes (Bengis und Nelson, 1977; Mullet et al, 1980; Møller, 1980).

Besondere Aufmerksamkeit wird einem Protein gewidmet, das Bindungsstelle für viele Elektronentransporthemmstoffe auf der reduzierenden Seite von Photosystem II ist. Die Möglichkeit, diesen Rezeptor durch Trypsin zu verändern, war ein erster Hinweis auf die Proteinnatur dieser Komponente (Regitz und Ohad, 1976; Renger, 1976). Das Protein, auf der Matrixseite der Thylakoidmembran liegend, überdeckt die in der Membran eingebetteten Redoxcarrier Q und B (beides spezielle Plastochinone) und vielleicht auch noch den Plastochinon-pool. Es hat die Eigenschaft einer Q-PQ-Oxidoreduktase (Trebst und Draber, 1979; Pfister et al, 1979) und wird wegen des in ihr enthaltenen Plastochinon-Kofaktors B-Protein genannt. Wenn das durch den primären Akzeptor Q reduzierte B Elektronen an den Plastochinon-pool weiterleitet, werden nicht nur zwei Elektronen übertragen, sondern auch zwei H^+ aus dem Matrixraum übernommen. Diese Protonenaufnahme jedoch erfolgt relativ zum Elektronentransport verzögert, was auf eine Protonenbarriere zwischen der wäßrigen Phase des Matrixraumes und dem Plastochinon-pool in der Lipidphase hindeutet (Witt, 1971; 1975; Junge, 1975). Diese Barriere ist wahrscheinlich ebenfalls ein Protein. Der Zusammenhang zwischen B-Protein und dieser Barriere ist nicht direkt nachgewiesen, aber wahrscheinlich (Renger,1977).

Die Problemstellung der vorliegenden Arbeit konzentriert sich auf die Identifizierung von Proteinkomponenten, die am Reduktions/Oxidationszyklus des Plastochinons beteiligt sind. Es wird versucht, über verschiedene Hemmstoffe Zugang zu solchen Proteinen zu gewinnen. Voraussetzungen für eine derartige Methodik sind (1) spezifisch wirkende Inhibitoren, (2) kovalente Bindung der Inhibitoren an ihren Wirkort, (3) radioaktive Markierung der Hemmstoffe und damit des Rezeptors und schließlich (4) eine Elektrophoresetechnik, die den komplexen Proteinteil der Thylakoidmembran befriedigend aufzulösen vermag.

Im ersten Kapitel wird zunächst die Methodik der Auftrennung und Identifizierung der membrangebundenen Proteine beschrieben. Dann werden zwei verschiedene Hemmstoffe, ^{14}C-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) und 4-Nitro-2-azido-6-(2',3'-^{3}H)isobutylphenol (^{3}H-DNSA), vorgestellt, die unter geeigneten Bedingungen kovalent mit Proteinen reagieren können. DCCD, eine aus der Peptidchemie bekannte Substanz, blockiert bereits in geringen Konzentrationen die Elektronentransportphosphorylierung in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten. Im zweiten Teil der Arbeit wird ein bisher noch nicht untersuchter Effekt dieser Substanz auf das entkoppelte Elektronentransportsystem selbst beschrieben und der Wirkort im Proteinteil der Thylakoidmembran gesucht.

Das Arylazid DNSA ist ein Abkömmling des bekannten Phenolherbizids Dinoseb und hemmt den Elektronentransport auf der reduzierenden Seite von Photosystem II. Arylazide produzieren bei Belichtung hochreaktive Molekülspezies, die kovalent an Biomoleküle binden können. Wenn radioaktiv markierte "Photolabel" außerdem eine hohe Affinität zu bestimmten Membranbereichen besitzen, sollten diese

Stellen vorzugsweise markiert werden und bei elektrophoretischer Auftrennung der Membran leicht aufzufinden sein. Der dritte Teil der Arbeit handelt von solchen Markierungsversuchen.

Im vierten Kapitel wird die Hemmstoffempfindlichkeit eines teilweise gereinigten Photosystem II-Systems untersucht, um einen isolierten Teilbereich der Thylakoidmembran näher zu charakterisieren. Da es immer auch das Ziel biochemischer Untersuchungen ist, das in Frage kommende Protein in reiner Form zu isolieren, stellen diese Experimente einen ersten Schritt in diese Richtung dar.

ERGEBNISSE

1. Die Analyse von Proteinen der Thylakoidmembran

Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Lipiden der Thylakoidmembran (Lichtenthaler und Park, 1963; Allen et al, 1972) ist relativ wenig über den Proteinteil bekannt, der ungefähr die Hälfte der gesamten Membranmasse ausmacht. Die Technik der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) erlaubt unter denaturierenden Bedingungen die Auftrennung von mehr als 30 Membranproteinen, von denen einige durch Änderung der Bedingungen auch noch weiter aufgelöst werden können. Die Identifizierung von Peptiden, deren Größe zunächst völlig unbekannt ist, erfordert ein Gelsystem, in dem möglichst viele Komponenten mit einem weiten Molekulargewichtsbereich zuverlässig aufgetrennt werden können. Ein solches System wird von Chua (1980) ausführlich beschrieben. Es vereinigt die Vorteile des alkalischen, diskontinuierlichen Puffersystems von Neville (1971) und eines linearen Acrylamid-Gradienten nach Margolis und Kendrick (1968). Die für diese Arbeit verwendeten 11-15%igen Acrylamidgele trennen Peptide mit einem Molekulargewicht von etwa 15 bis 100 Kilodalton (kD) optimal. In ihrer Größe darüber oder darunter liegende Proteine sind zwar gut sichtbar, die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes wird aber sehr ungenau. Der zu erwartende Fehler bei der Molekulargewichtsbestimmung im optimalen Bereich eines 10%igen Acrylamidgeles wird von Dunker und Rueckert (1969) mit 5-6%, von Weber und Osborn (1969) mit ±10% und für bestimmte Proteine von Neville (1971) bis zu 25% angegeben. Unter der Voraussetzung eines völlig linearen 11-15%igen Acrylamidgradienten sollte man bei Molekulargewichtsbestimmungen diese Fehlerspannen berücksichtigen.

Die Präparation möglichst reiner Thylakoide erfordert nach der üblichen Prozedur der Blatthomogenisierung und differentiellen Zentrifugation noch ein mehrmaliges Waschen der Membranen, um lösliche Stromaproteine, vor allem Ribulosebisphosphat-Carboxylase, zu entfernen. Trotzdem bindet im allgemeinen ein Teil dieses Enzyms während der Isolierung an die Membran. Die große Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 55kD (Poulsen et al, 1976) wird im Gel als eine Bande sichtbar, die eine etwas größere Mobilität hat als die β-Untereinheit der ATP-Synthetase (Abb.2). Von den 5 Untereinheiten des Kopplungsfaktors CF_1 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \varepsilon$) treten α und β mit Molekulargewichten von 60 bzw. 56kD (Nelson, 1976) deutlich hervor. Sämtliche Untereinheiten lassen sich in SDS-Acrylamidgelen mit Hilfe von Antikörpern (Immunelektrophorese) nachweisen (Høyer-Hansen et al, 1979). CF_o, der lipophile Basalteil der ATP-Synthetase, läuft im Bereich der freien Pigmente und ist bei der in Abb.2 aufgetragenen Proteinmenge nicht zu erkennen. Er bindet jedoch spezifisch DCCD und kann mit radioaktivem Carbodiimid sichtbar gemacht werden (vergleiche Kapitel 2).

SDS-solubilisierte Thylakoidmembranen zeigen unter den hier verwendeten Bedingungen drei grün gefärbte Banden, von denen die unterste die Zone der freien Pigmente darstellt. Die beiden anderen sind Chlorophyll-Protein-Banden. Nach der von Machold, Simpson und Møller (1979) vorgeschlagenen Nomenklatur handelt es sich bei der Bande mit geringster Mobilität um das P700-Chl_a-Protein 1 (Chl_a-P1) mit einem Molekulargewicht von 110kD, das identisch ist mit dem CPI anderer Autoren (Andersen et al, 1978; Delepelaire und Chua, 1979; Henriques und Park, 1978; Machold und Meister, 1979; Thornber et al, 1967). Die Löschung der Chlorophyll-Fluoreszenz in dieser Bande (im nicht fixierten Gel)

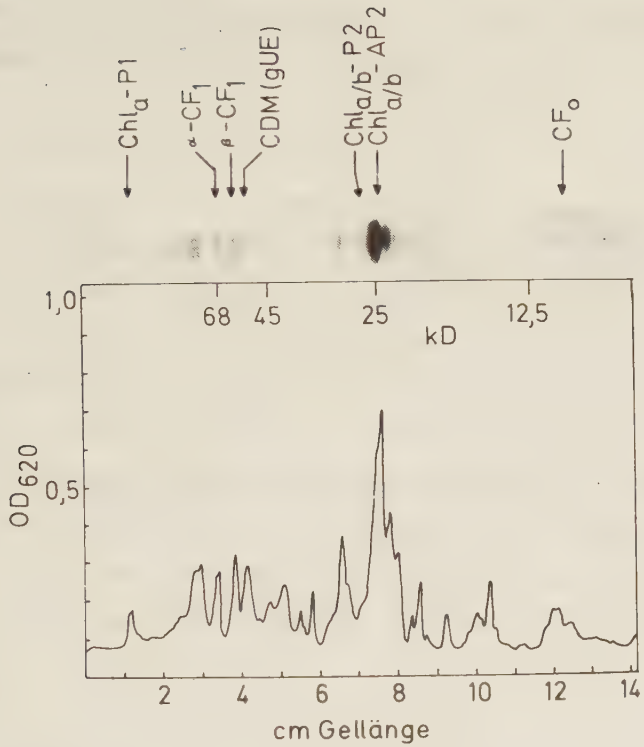


Abb.2: Elektrophoretische Trennung von stromafreien Spinatthylakoiden (35µg Chl = 175µg Protein) in einem 11-15%igen SDS-Polyacrylamid-Flachgel. Die Membranen wurden mit SDS solubilisiert (SDS/Chl = 20/1) und nach der Elektrophorese mit Serva Blau G gefärbt. Die Abbildung zeigt Photographie und Densitogramm des Gels. Drei grüne Banden sind vor der Färbung im Bereich von Chl$_a$-P1, Chl$_{a/b}$-P2 und CF$_o$ sichtbar. Chl$_a$-P1: P700-Chl$_a$-Protein 1; α-CF$_1$, β-CF$_1$: Untereinheiten des Kopplungsfaktors; CDM (gUE): große Untereinheit der Carboxydismutase; Chl$_{a/b}$-P2: Light-harvesting-Chl$_{a/b}$-Protein 2; Chl$_{a/b}$-AP2: Apoprotein des Light-harvesting-Chl$_{a/b}$-Proteins 2; CF$_o$: Basalteil des Kopplungsfaktors

und P700-Differenzspektren deuten darauf hin, daß Chl_a-P1 seine native Konformation während der Solubilisierung und Elektrophorese erhalten hat (Machold et al, 1979).

Die zweite Chlorophyll-Protein-Bande ist das Light-harvesting-$Chl_{a/b}$-Protein 2 ($Chl_{a/b}$-P2, von anderen Autoren LHCP (Anderson et al, 1978) oder CPII (Machold und Meister, 1979; Remy und Hoarau, 1978; Thornber et al, 1967) genannt), dessen Chl a/b-Verhältnis bei 1 liegt und etwa 50% des gesamten Chlorophylls enthält (Anderson et al, 1978; Hiller et al, 1979). Die Größe und Anzahl der zu diesem Protein gehörenden Untereinheiten ist unklar, jedoch ein 25kD-Apoprotein ($Chl_{a/b}$-AP2) scheint mit einiger Sicherheit an der Struktur des Light-harvesting-Proteins beteiligt zu sein (für eine Übersicht siehe Thornber et al, 1979).

Es gibt Hinweise, daß das gesamte Chlorophyll der Thylakoidmembran in vivo proteingebunden vorliegt, da entsprechend milde Solubilisierungs-und Elektrophoresebedingungen nahezu kein freies Pigment mehr erzeugen (Markwell et al, 1979).

Einige weitere Polypeptide wurden bereits identifiziert, jedoch bereitet die Identifizierung durch Vergleich zweier Bandenmuster in verschiedenen Veröffentlichungen auf Grund unterschiedlicher Trennbedingungen und auch unterschiedlicher Organismen große Schwierigkeiten. Erst aufwendige immunologische Studien oder radioaktive Markierungsversuche in ein und demselben System können hier Klarheit verschaffen.

2. Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)

2.1. DCCD als Hemmstoff des entkoppelten Elektronentransportes

Grundlage für die Untersuchungen über den Einfluß von DCCD auf den photosynthetischen Elektronentransport sind frühe Experimente von McCarty und Racker (1967) und Uribe (1972). Ihre Versuche zeigten, daß DCCD den an die Phosphorylierung gekoppelten Elektronentransport parallel zur ATP-Bildung hemmt. Bei Zugabe eines Entkopplers kann die Inhibierung nicht vollständig aufgehoben werden - ein Effekt, der bei reinen Energietransferhemmstoffen wie z.B. Dio-9 oder Phlorizin nicht beobachtet wird (McCarty, 1977) und auf eine zusätzliche Hemmwirkung des Carbodiimids auf den entkoppelten Elektronentransport hindeutet.

Die Hemmung des gekoppelten Elektronenflusses durch DCCD beruht primär auf einer Inaktivierung des ATP-Synthetase-Komplexes (CF_1-CF_o-Komplex). Der die Protonentranslokation katalysierende Basalteil CF_o wird durch DCCD so modifiziert, daß ein Ausgleich des pH-Gradienten nicht mehr möglich ist und auf diese Weise der Elektronentransport sekundär gehemmt wird. Die Inhibierung des entkoppelten Elektronentransportes durch DCCD wurde bisher nicht untersucht und soll in diesem Teil der Arbeit näher charakterisiert werden.

Eine Substanz, die den photosynthetischen Elektronentransport hemmt, besitzt im allgemeinen eine spezifische Hemmstelle, an der sie den Elektronenfluß unterbricht. Hemmstoffe, die einzelne Teilreaktionen des Photosyntheseapparates selektiv blockieren,

ermöglichen die Messung des nicht blockierten Teilstückes durch Zugabe künstlicher Elektronendonatoren und/oder -akzeptoren. Zum Beispiel verhindert DCMU den Elektronentransfer zwischen Q und dem Plastochinon-pool. Der durch Ascorbat reduziert gehaltene Donor DAD kann so ohne Beteiligung von Photosystem II Elektronen bei Plastocyanin einspeisen und über Photosystem I auf den künstlichen Akzeptor Methylviologen übertragen. Der Einfluß eines Inhibitors kann durch richtige Wahl der Donatoren und Akzeptoren auf einige wenige funktionelle Komponenten des Elektronentransportsystems eingegrenzt werden. Abbildung 3 veranschaulicht den photosynthetischen Elektronentransport in linearer Schreibweise und zeigt die im folgenden verwendeten artifiziellen Donor-/Akzeptor-Systeme bzw. die zur Messung von Teilsequenzen erforderlichen Hemmstoffe.

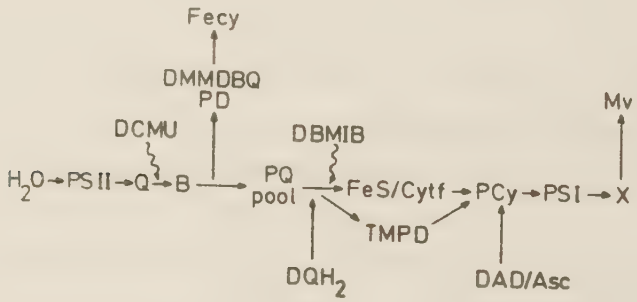


Abb.3: Schema des photosynthetischen Elektronentransportes mit artifiziellen Donor- und Akzeptorsystemen. Die Hemmstellen von DCMU und DBMIB sind ebenfalls angedeutet.

Akzeptoren: PD: Phenylendiamin; DMMDBQ: Dimethylmethylendioxo-p-benzochinon; Fecy: Ferricyanid; MV: Methylviologen; TMPD: N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin; Donatoren: DQH_2: Durohydrochinon; DAD: Diaminodurol; Asc: Na-Ascorbat

Abbildung 4 zeigt den Einfluß steigender DCCD-Konzentrationen auf den durch NH_4Cl entkoppelten Elektronentransport von Wasser zu Methylviologen. Methylviologen wird auf Grund seines stark negativen Redoxpotentials (-440mV) nur von Photosystem I reduziert.

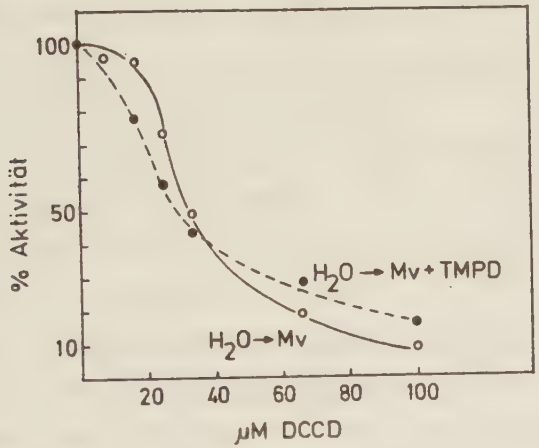


Abb.4: Hemmung des photosynthetischen Elektronentransportes durch DCCD. Methylviologen ist als künstlicher Akzeptor und NH_4Cl als Entkoppler eingesetzt.

In 3ml Reaktionsansatz waren enthalten: Chloroplasten mit einem Chlorophyllgehalt von 50µg; Tricin-NaOH pH8,0 50mM; NaCl 50mM; $MgCl_2$ 5mM; Mv 0,1mM; NaN_3 0,3mM; NH_4Cl 10mM. Die DCCD-Hemmung in Gegenwart von 30µM TMPD und 1µM DBMIB ist ebenfalls dargestellt. Die Kontrollraten ohne DCCD betrugen 214, mit TMPD und DBMIB im Ansatz 169µMole O_2/mg Chl/h (gemessen als O_2-Aufnahme in der Sauerstoffelektrode)

Die Reaktion kann, da es sich um einen autoxidablen Akzeptor handelt, als Sauerstoffaufnahme in einem Oxigraphen verfolgt werden. Mit Wasser als nativem Donor ist die Methylviologen-Reduktion ab-

hängig von allen Komponenten des Elektronentransportsystems mit Ausnahme der auf der reduzierenden Seite von Photosystem I liegenden Carrier Ferredoxin und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase. Da in diesem und den folgenden Experimenten die Energietransferinhibitor-Eigenschaften von DCCD durch Zugabe von Entkoppler ausgeschaltet sind, zeigt sich der direkte Einfluß auf die Elektronentransportrate. DCCD hemmt diese Rate zu 50% in einer Konzentration von etwa 30µM (Abb.4).

N-substituierte Phenylendiamine wie TMPD werden auf der Innenseite der Thylakoidmembran durch Plastohydrochinon reduziert (Trebst und Reimer, 1973a). Dabei entsteht ein positiv geladenes, für die Membran impermeables Phenylendiamin-Radikal, das durch Plastocyanin oxidiert wird. Hemmstoffe wie DBMIB oder DNP-INT, die die Oxidation des Plastochinols verhindern, haben in Gegenwart katalytischer Mengen TMPD keinen Einfluß mehr, da ihre Hemmstelle umgangen wird. Die Hemmwirkung von DCCD wird durch einen solchen TMPD-bypass nicht aufgehoben, d.h. in diesem Konzentrationsbereich hat DCCD keinen Einfluß auf die Plastochinol-Oxidation (Abb.4).

Der Elektronendonor Diaminodurol (DAD) erlaubt es, eine nur von Plastocyanin und Photosystem I abhängige Methylviologen-Reduktion zu messen. Auch bei sehr hohen DCCD-Konzentrationen bleibt dieser Teilschritt des Elektronentransportsystems unbeeinflußt (Abb.5).

Anders gegenüber DCCD verhält sich die nur von Photosystem II abhängige Reduktion von Fecy (in Gegenwart von DBMIB oder DNP-INT), der zwei unterschiedliche primäre Akzeptoren (Mediatoren) vorgeschaltet sind. Während die Reaktion mit dem Benzochinon DMMDBQ als Mediator nur zu etwa 40% gehemmt werden kann, erweist sich die Phenylendiamin-Reduktion als wesentlich empfindlicher gegen-

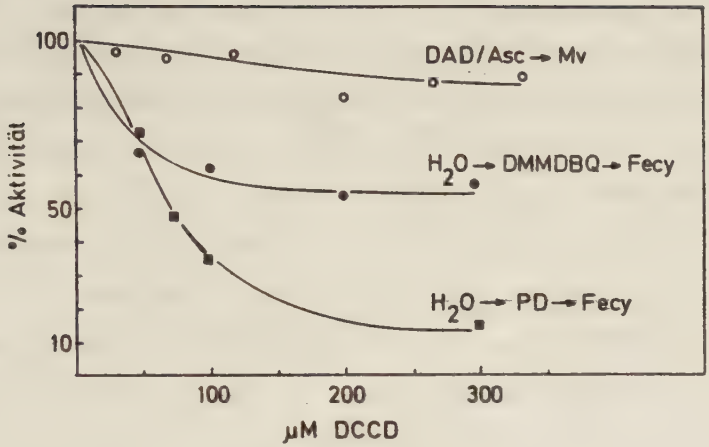


Abb.5: Einfluß steigender DCCD-Konzentrationen auf die Photosystem I-abhängige Methylviologen-Reduktion mit DAD/Asc als Donor und auf die Photosystem II-abhängige Reduktion von DMMDBQ bzw. PD mit Fecy als Endakzeptor und H_2O als Donor.

Wie in Abb.4 enthielt der Reaktionsansatz entweder: Mv 0,1mM; NaN_3 0,3mM; DAD 1mM; Asc 3mM; DCMU 1µM oder: Fecy 3mM; DMMDBQ 0,4mM bzw. PD 0,1mM; DNP-INT 1µM; NH_4Cl 6mM. Das Experiment mit PD als Akzeptor (Mediator) wurde in MES-NaOH-Puffer pH6,0 anstatt in Tricin-NaOH pH8,0 durchgeführt. Die Kontrollraten ohne DCCD betrugen 184 bzw. 200µMole Fecy/mg Chl/h für die Reduktion von Fecy über DMMDBQ bzw. PD und 435µMole O_2/mg Chl/h für die Mv-Reduktion

über dem Carbodiimid (Abb.5).

Mit Hilfe des künstlichen Donors Durohydrochinon (DQH_2) kann eine weitere Teilsequenz des Elektronentransportsystems untersucht wer-

den (White et al, 1978; Izawa et al, 1978). In Gegenwart von DCMU kann Durohydrochinon Methylviologen über Photosystem I reduzieren. Die Reaktion ist DBMIB-sensitiv und läuft vermutlich über den Cytochrom f/b_6-Komplex (Oettmeier et al, 1981). DCCD hemmt sowohl die nicht entkoppelte Rate als auch die Rate in Gegenwart von NH_4Cl (Abb.6).

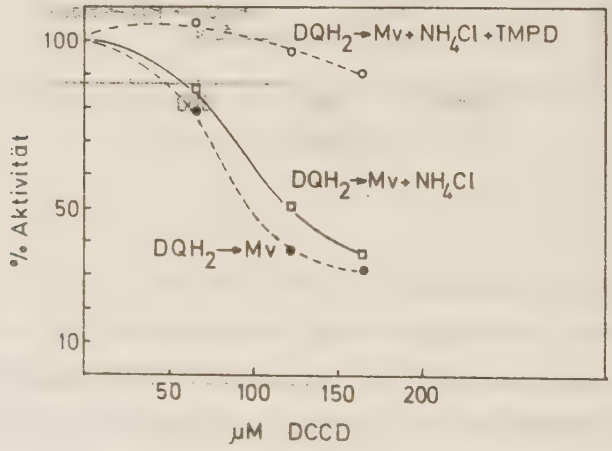


Abb.6: Einfluß steigender DCCD-Konzentrationen auf die Methylviologen-Reduktion mit Durohydrochinon (DQH_2) als Elektronendonor.

Der Reaktionsansatz enthielt wie in Abb.4 zusätzlich DQH_2 0,5mM (unmittelbar vor Gebrauch in Methanol gelöst) und, wo angegeben, TMPD 30µM (+DBMIB 1µM) und NH_4Cl 10mM. Die Kontrollraten ohne DCCD betrugen 86µMole O_2/mg Chl/h (Mv), 184 (Mv + NH_4Cl) und 360 µMole O_2/mg Chl/h (Mv+NH_4Cl+TMPD)

Allerdings ist für eine 50%ige Hemmung die Konzentration an Inhibitor etwa 4mal so hoch (120µM) wie im System H_2O→Mv. Durch TMPD wird diese Hemmung aufgehoben, was auf eine zweite, der DBMIB analoge Hemmstelle im Bereich der Plastochinol-Oxidation hinweist.

2.2. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.1.

DCCD hemmt nicht nur den gekoppelten Elektronentransport als indirekte Folge der ATP-Synthetase Inaktivierung, sondern hat auch einen ganz direkten Einfluß auf das entkoppelte Elektronentransportsystem. Die Untersuchungen von Teilsequenzen des Elektronenflusses mit Hilfe künstlicher Donatoren und Akzeptoren zeigen, daß

1. der von beiden Photosystemen abhängige Elektronentransport von H_2O zu Methylviologen zu 50% bei etwa 30µM DCCD gehemmt wird;
2. die Photosystem I-abhängige Oxidation von DAD mit Methylviologen als Akzeptor auch von sehr hohen DCCD-Konzentrationen unbeeinflußt bleibt;
3. die Photosystem II-abhängige Reduktion von DMMDBQ wenig, die von PD aber stark gehemmt wird;
4. die Oxidation von Durohydrochinon via Cytochrom f/b_6 und Photosystem I zu 50% bei etwa 120µM gehemmt wird;
5. ein TMPD-bypass im Durohydrochinon-System die DCCD-Hemmung vollständig aufhebt, nicht aber die Hemmung des Elektronenflusses von H_2O zu Methylviologen.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß DCCD den Elektronentransport an zwei Stellen unterbrechen kann: 1. Durch TMPD wird die Inhibierung des Elektronenflusses von Durohydrochinon zu Methylviologen aufgehoben. Damit verhält sich DCCD wie der Hemmstoff DBMIB, der die Plastochinol-Oxidation durch den Cytochrom f/b_6-Komplex inhibiert. 2. Diese der DBMIB analogen Hemmstelle ist jedoch weit unempfindlicher gegenüber dem Carbodiimid (I_{50}= 120µM) als die zweite, deren I_{50} bei 30µM liegt. Ein Vergleich

der beiden Photosystem II-abhängigen Reaktionen mit DMMDBQ und PD als Akzeptoren erlaubt eine nähere Charakterisierung dieser zweiten Hemmstelle. Nach derzeitiger Kenntnis reduziert der primäre Akzeptor von Photosystem II (Q) ein spezielles Plastochinon B (Bouges-Bouques, 1973; Pulles et al, 1976) zum Plastochinol-Anion, bevor im nächsten Schritt unter Aufnahme von Protonen der Matrixseite der Plastochinon-pool reduziert wird. Man nimmt an, daß das Benzochinon DMMDBQ durch B direkt zum Semichinon reagiert (Trebst et al, 1976), ein Vorgang, an dem keine Protonen beteiligt sind. Da diese Reaktionsfolge nur in relativ geringem Maße von DCCD beeinflußt wird, die durch den Plastochinon-pool erfolgende Reduktion von Phenylendiamin als protonenabhängige Reaktion dagegen durch DCCD gehemmt wird, liegt die zweite Hemmstelle auf Seiten der Reduktion des Plastochinon-pools.

In Kapitel 2.1. wurde bereits die Wirkung von DCCD auf den Basalteil des ATP-Synthetase-Komplexes dargestellt. DCCD blockiert sowohl den Protonentransport durch CF_o als auch durch F_o, dem Protonenkanal des mitochondrialen Kopplungsfaktors. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß auch die Protonentranslokation der Cytochrom-Oxidase DCCD-empfindlich ist (Casey et al, 1979). Der Reduktions/Oxidations-Zyklus des Plastochinons ist gekoppelt an eine Aufnahme von Protonen auf der Außenseite der Thylakoidmembran und einer Freisetzung dieser H^+-Ionen im Innenraum der Vesikel. Der der Matrixseite zugewandte Bereich des Plastochinon-pools steht nicht in direkter Verbindung mit der hydrophilen Umgebung, sondern ist vermutlich durch ein Protein von der wäßrigen Phase abgeschirmt (Renger, 1976). Zudem gibt es Hinweise auf eine Barriere, die die Aufnahme von Protonen relativ zur Plastochinon-Reduktion verzögert (Ausländer und Junge, 1974).

Es liegt die Vermutung nahe, daß die Hemmung des entkoppelten Elektronentransportes durch DCCD primär - in Analogie zum bereits bekannten DCCD-Effekt - als Hemmung des Protonentranslokationsschrittes während der Plastochinon-Reduktion und -Oxidation aufzufassen ist. Wenn Protonenkanäle auf Reduktions- und Oxidationsseite des Plastochinon-pools existieren und durch DCCD "verschlossen" werden können, führt das unmittelbar zur Hemmung des Elektronenflusses, da der Chinon-shuttle auf Protonenaufnahme und -abgabe angewiesen ist (Sane et al, 1979).

Im ATP-synthetase-Komplex von Mitochondrien und Chloroplasten bindet DCCD kovalent an den Basalteil des Enzyms. Auf der Grundlage der eben beschriebenen Arbeitshypothese erschien es zunächst sinnvoll, nach Proteinen zu suchen, die mit DCCD reagieren und damit potentiell Bestandteil der hypothetischen Protonenkanäle sein können.

2.3.1. ^{14}C-DCCD-markierte Polypeptide der Thylakoidmembran

In einem Vorversuch wurden Spinatchloroplasten mit unterschiedlichen Mengen an radioaktivem DCCD inkubiert. Nach Solubilisierung der Membranen mit SDS und elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel fixiert, die Proteine gefärbt und schließlich der Hintergrund des Gels entfärbt. Während dieser Behandlung wird auch nicht fest gebundenes DCCD entfernt und kann auf einem Autoradiogramm keine Schwärzung hervorrufen.

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Abbildung 7. In Gel a ist das Verhältnis von ^{14}C-DCCD zu Chlorophyll 42nMole/mg. Das zugehörige

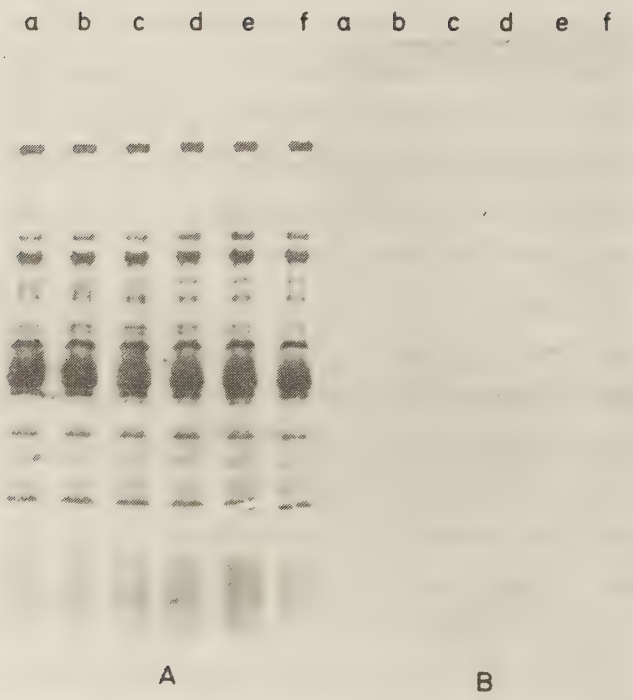


Abb.7: Polypeptidmuster (A) und Autoradiogramm (B) von Spinatthylakoiden nach SDS-Gelelektrophorese in einem 11-15%igen Polyacrylamidgel. Die gewaschenen Thylakoide wurden vor der Solubilisierung mit steigenden Mengen ^{14}C-DCCD inkubiert: Gel a 42nMole DCCD/mg Chl; Gel b 84; Gel c 168; Gel d 252. Die Membranen in Gel e wurden mit 500nMolen nicht radioaktivem DCCD vor- und 168nMolen ^{14}C-DCCD/mg Chl nachinkubiert. Gel f zeigt das zu e umgekehrte Experiment: Vorinkubation mit ^{14}C, Nachinkubation mit nicht markiertem DCCD

Autoradiogramm zeigt im wesentlichen 2-3 Banden, deren unterste im Bereich der freien Lipide liegt. Es handelt sich hier um das DCCD-Bindungsprotein (CF_o) mit einem Molekulargewicht von etwa 8kD (Nelson et al, 1977). Mit steigenden DCCD-Konzentrationen (Gele b-d) wächst nicht nur die Zahl der markierten Banden, sondern auch bereits bei niedrigeren Konzentrationen markierte Polypeptide reagieren, wie aus der zunehmenden Schwärzung des Autoradiogramms an den entsprechenden Stellen erkennbar, weiter mit dem Carbodiimid. Vorinkubation mit nicht radioaktivem DCCD und anschließende Zugabe von ^{14}C-DCCD ergibt keine Banden auf dem Autoradiogramm (Gel e). Nachinkubation mit nicht markiertem Hemmstoff zeigt keinen Verdrängungseffekt (Gel f).

Unter den Bedingungen dieses Experimentes ist selbst bei 250nMolen DCCD/mg Chl (Gel d) noch keine ausgeprägte Hemmung des Elektronenflusses zu erwarten. In den vorangegangenen Versuchen wurde ermittelt, daß eine 50%ige Hemmung der Elektronentransportrate von H_2O zu Methylviologen bei etwa 30µM DCCD eintritt (vergl. Abb.4). Dieser Wert schwankt je nach Chloroplastenpräparation und kann auch 50µM erreichen. Die Bedingungen im Markierungsversuch (Abb.7) waren so gewählt, daß in den Gelen a bis d die DCCD-Konzentration zwar zwischen 65 und 380µM lag, die Menge an Chlorophyll aber ebenfalls sehr viel höher (1,5mg Chl/ml) war als in den Reaktionsansätzen für die Messung des Elektronentransportes (17µg Chl/ml). Um gleiche Hemmung bei höherer Chlorophyll-Konzentration zu erreichen, muß auch die Innibitor-Konzentration erhöht werden.

In einem weiteren Experiment wurde daher versucht, einen Zusammenhang zwischen Hemmung des Elektronentransportes von H_2O zu Methylviologen und dem Auftreten markierter Polypeptide herzustellen. Da

auf dem Autoradiogramm nur die Banden sichtbar werden sollten, die bei etwa 50-70%iger Hemmung auftreten, wurden die Chloroplasten mit nicht radioaktivem DCCD vorinkubiert. Die Menge war so gewählt, daß der Elektronenfluß zu etwa 10-15% gehemmt war.

Abbildung 8 zeigt Polypeptidmuster (A) und zugehöriges Autoradiogramm (B) von Thylakoiden, die mit Ausnahme von Gel 1 mit nicht radioaktivem DCCD vor- und ^{14}C-DCCD nachinkubiert wurden. Die Vorinkubation mit 0,3mM DCCD hemmt den Elektronentransport zu ca. 15%. Wenn bei 15%iger Hemmung die für die Inhibierung in Frage kommenden Banden noch nicht oder nur schwach auf dem Autoradiogramm sichtbar sind, dann sollten diese Banden in Gel 2 (44% Hemmung) und 3 (67% Hemmung) besonders hervortreten. Aus den Autoradiogrammen in Abbildung 8 geht hervor, daß bei den hier verwendeten DCCD-Konzentrationen im Gegensatz zu Abbildung 7 sehr viele Proteine radioaktiv sind. In Gel 1 der Abbildung 8 sind diejenigen Banden markiert, die möglicherweise keinen Einfluß auf die Hemmung des Elektronentransportes haben. Auf den Autoradiogrammen zu Gel 2 und 3 sind zwei Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 19 und 20kD (Pfeile) zu sehen, die in Gel 1 nahezu keine Markierung aufweisen und nun mit zunehmender Inhibierung des Elektronenflusses besonders stark hervortreten.

2.3.2. Einfluß von DCCD auf den entkoppelten Elektronentransport in Thylakoiden von Gerstenmutanten

Sollte es gelingen, DCCD-insensitive Mutanten zu finden, wäre eine nähere Charakterisierung der an der Hemmung beteiligten Proteine sehr erleichtert. Es standen neben dem Wildtyp drei Gerstenmutante

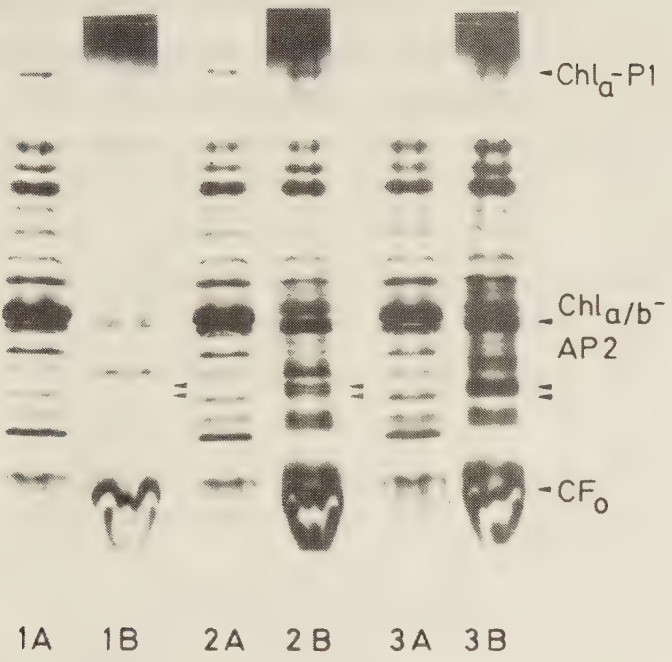


Abb.8: Polypeptidmuster (A) und Autoradiogramme (B) von Spinatthylakoiden, deren Elektronentransport von H_2O zu Methylviologen durch ^{14}C-DCCD zu 15%, 44% und 65% gehemmt wurde.
Gel 1: 15%ige Hemmung durch 0,3mM ^{14}C-DCCD
Gel 2: 44%ige Hemmung durch Vorinkubation mit 0,3mM nicht markiertem DCCD und Nachinkubation mit 1,2mM ^{14}C-DCCD
Gel 3: 67%ige Hemmung durch Vorinkubation mit 0,3mM nicht markiertem DCCD und Nachinkubation mit 2,1mM ^{14}C-DCCD
Reaktionsbedingungen: 0,3ml Chloroplastensuspension (0,3mg Chl) wurden mit DCCD inkubiert und ein Aliquot (50µl) zur Bestimmung der Elektronentransportrate (siehe Abb.4) entnommen. Die restlichen 0,25ml wurden zentrifugiert, das Sediment (Thylakoide) mit SDS solubilisiert und elektrophoretisch in einem 11-15%igen Gel aufgetrennt

mit kleinen photosynthetischen Einheiten (chlorina-f2, viridis-k^{23} und xantha-1^{35}) für einen Test zur Verfügung (Carlsen, 1977). Den Einfluß steigender DCCD-Konzentrationen auf den Elektronentransport von H_2O zu Methylviologen in den verschiedenen Mutanten zeigt Abbildung 9. Der Wildtyp ist ähnlich empfindlich wie die

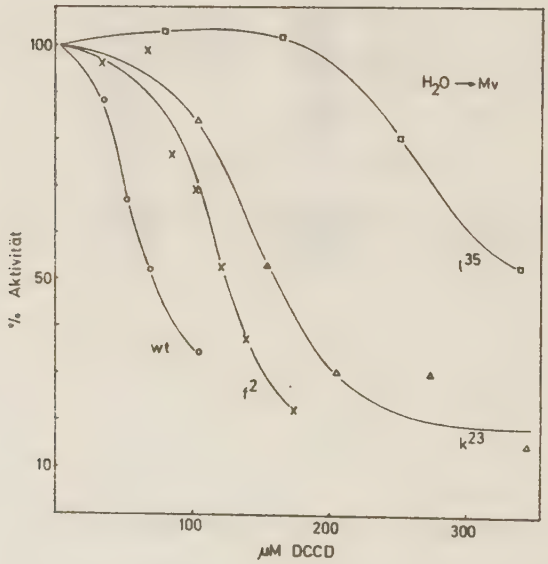


Abb.9: Einfluß steigender DCCD-Konzentrationen auf den entkoppelten Elektronentransport von H_2O zu Methylviologen in Thylakoiden von Wildtyp-Gerste und verschiedenen Gerstenmutanten. Die Raten wurden mit jeweils gleichen Chlorophyllmengen im Reaktionsansatz (siehe Abb.4) bestimmt. Die Kontrollraten ohne DCCD betrugen 134, 212, 424 und 382 µMole O_2/mg Chl/h für den Wildtyp und die Mutanten chlorina-f2, viridis-k^{23} und xantha-1^{35}

bisher verwendeten Spinatchloroplasten, die Mutante xantha-l[35] dagegen ist nahezu DCCD-insensitiv. Es ist üblich, Elektronentransportraten wie in Abbildung 9 auf die Chlorophyllmenge zu beziehen. Die Mutanten besitzen jedoch ein sehr hohes Protein/Chlorophyll-Verhältnis, so daß bei Verwendung gleicher Chlorophyll-Konzentrationen der Reaktionsansatz im Fall der Mutante l[35] etwa 5mal so viel Protein wie der Wildtyp enthält. Es mußte damit gerechnet werden, daß so hohe Proteinmengen die DCCD-Hemmung beeinflussen. Der Versuch wurde deshalb unter Verwendung gleicher Proteinkonzentrationen im Reaktionsgefäß wiederholt (Abb.10).

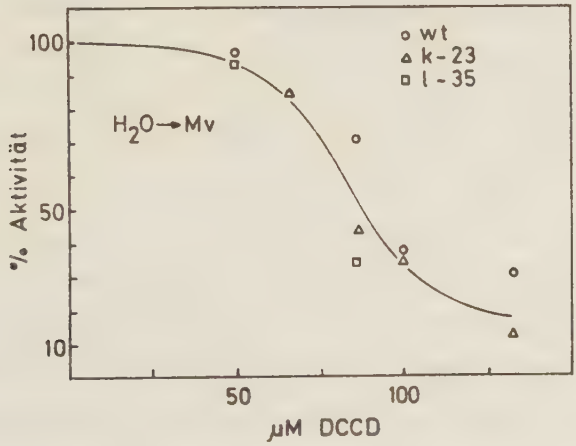


Abb.10: Einfluß steigender DCCD-Konzentrationen auf den entkoppelten Elektronentransport von H_2O zu Methylviologen in Thylakoiden von Wildtyp-Gerste und verschiedenen Mutanten. Im Gegensatz zu Abb.9 wurden hier statt gleicher Chlorophyll- gleiche Proteinmengen verwendet. Alle anderen Reaktionsbedingungen und Kontrollraten entsprechen denen von Abb.9

Wildtyp und Mutante waren unter diesen Bedingungen gegenüber DCCD in etwa gleich empfindlich. Die scheinbare DCCD-Insensitivität beruht deshalb wahrscheinlich auf einer unspezifischen Bindung des Carbodiimids an Chloroplastenproteine, die so die wirksame Hemmstoffkonzentration herabsetzen.

2.3.3. Einfluß von Rinderserumalbumin auf den durch DCCD gehemmten Elektronentransport

Die Experimente mit den Gerstenmutanten weisen darauf hin, daß Proteine offenbar die Hemmwirkung des Carbodiimids beeinflussen können. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde Rinderserumalbumin (RSA) zu den durch DCCD gehemmten Chloroplasten gegeben. Aus Abbildung 11 geht hervor, daß RSA in der Lage ist, die Inhibierung in beträchtlichem Maße aufzuheben. Die doppelt reziproke Auftragung der ermittelten Werte deutet auf eine Kompetition zwischen Protein und DCCD hin (Abb.11). Dabei spielt die Reihenfolge der Zugabe von RSA und Inhibitor keine Rolle (nicht gezeigt). In allen Experimenten, in denen der Elektronenfluß gemessen wurde, setzte die Hemmwirkung unmittelbar nach Zugabe des Inhibitors ein. RSA hebt die Hemmung ebenso schnell wieder auf.

Es ist jedoch möglich, daß DCCD zwar sofort hemmt, aber trotzdem längere Zeit benötigt, um kovalent an seinen Wirkort zu binden. Doch auch nach 90 Minuten Inkubation der Chloroplasten mit DCCD hebt RSA die Hemmung um den gleichen Betrag auf wie zu Beginn der Inkubation (Abb.12).

In diesem Versuch fällt auf, daß die Elektronentransportrate in

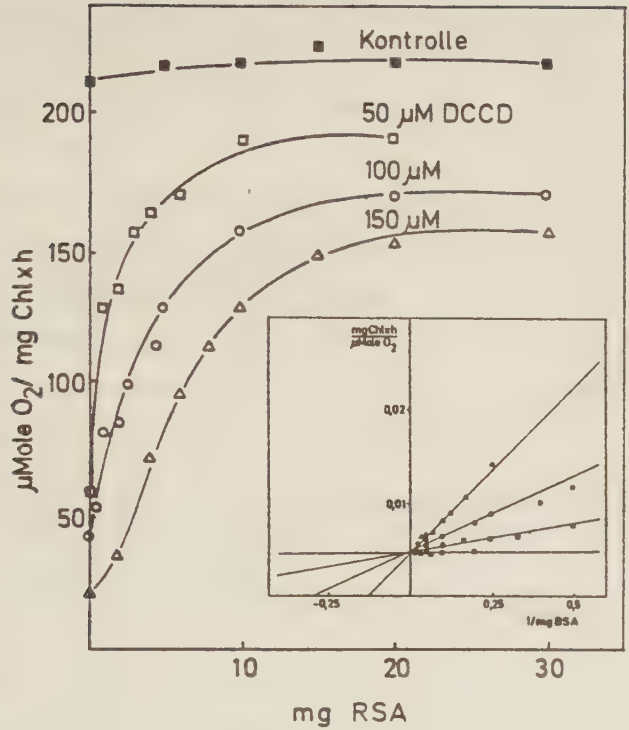


Abb.11: Einfluß steigender RSA-Konzentrationen auf den durch DCCD gehemmten Elektronenfluß von H_2O zu Methylviologen in Spinatchloroplasten. Einschub: doppelt reziproke Darstellung der Meßergebnisse. Der Reaktionsansatz entspricht dem von Abb.4

Gegenwart von DCCD und RSA zu allen Zeiten höher liegt als die Kontrollrate (-DCCD ± RSA). Dieser Effekt wurde immer wieder beobachtet, aber nicht weiter untersucht.

Die Aufhebung der Hemmwirkung durch Serumalbumin macht es wahrscheinlich, daß DCCD nicht fest an seinen Wirkort bindet und durch Proteine von dieser Stelle entfernt wird. Inkubation von

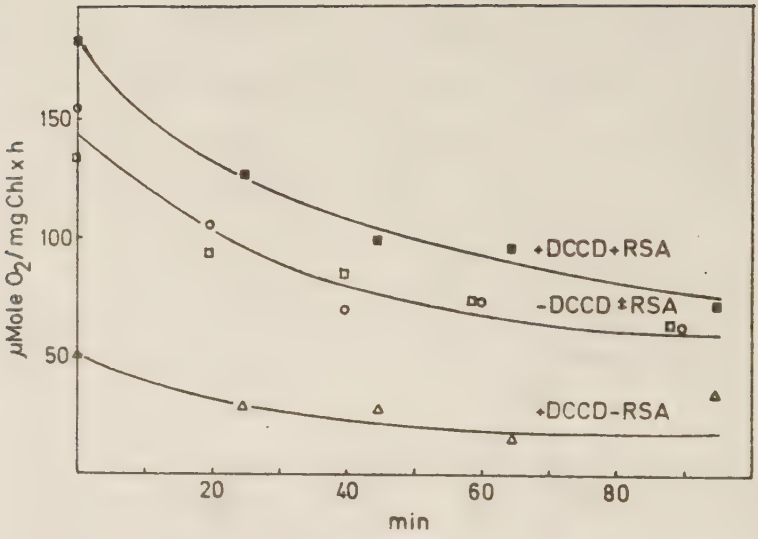


Abb.12: Aufhebung der DCCD-Hemmung durch RSA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Gemessen wurde der entkoppelte Elektronentransport von H_2O zu Methylviologen in Spinatthylakoiden, die im Dunkeln bei 15°C im Reaktionsansatz (siehe Abb.4) mit oder ohne DCCD (100µM) verschieden lange inkubiert wurden. Nach Bestimmung der Anfangsrate wurden dem Reaktionsansatz 20mg gelöstes RSA zugefügt

RSA mit ^{14}C-DCCD führt zu radioaktiv markiertem Protein (nicht gezeigt), ein Hinweis auf die Fähigkeit des Albumins, locker gebundenes Carbodiimid von der Thylakoidmembran zu entfernen.

Hohe Konzentrationen an RSA, wie sie zur Aufhebung der Inhibierung nötig sind, könnten aber auch eine Konformationsänderung der Membran verursachen und auf diese Weise trotz fest gebundenen DCCD's die Hemmwirkung aufheben. In diesem Fall sollte nach Entfernen des

Albumins von der Membran die Hemmung wieder einsetzen. Das Ergebnis eines Versuches, in dem RSA durch wiederholtes "Waschen" der Thylakoide entfernt wurde, zeigt Tabelle 1. Ohne den Waschvorgang

Tabelle 1: Einfluß des Waschvorgangs auf die durch DCCD gehemmte Elektronentransportrate von H_2O zu Methylviologen mit und ohne RSA

	µMole O_2/mg Chl x h			
	Kontrolle	+60mg RSA	+450µM DCCD	+450µM DCCD + 60mg RSA
ohne "Waschen"	186	187	14	106
mit "Waschen"	165	230	121	167

Versuchsbedingungen: 4 Proben mit je 300µg Chl (Spinatthylakoide) in 9ml Reaktionsansatz (siehe Abb.4) wurden mit entsprechenden Mengen RSA bzw. DCCD versetzt (Spalten 2 bis 4). Von jeweils 3ml jeder Probe wurde die Rate bestimmt (ohne "Waschen"). Die restlichen 6ml wurden mit 20ml STN (0,4M Saccharose, 50mM NaCl, 50mM Tricin-NaOH pH8,0, 5mM $MgCl_2$) verdünnt, die Membranen abzentrifugiert, noch einmal in 20ml STN suspendiert, zentrifugiert und schließlich in 0,2ml STN resuspendiert. 0,1ml jeder Probe diente dann zur Bestimmung der Elektronentransportrate (mit "Waschen")

steigt die durch DCCD gehemmte Elektronentransportrate durch Zugabe von Albumin von 14 auf 106µMole O_2/mg Chl/h und erreicht damit 57% der Kontrollrate. Nach dem "Waschen" der Membranen wird die Kontrollrate erreicht. Die Hemmung setzt also nicht wieder ein, sondern wird nun zu 100% aufgehoben. Aus diesem Experiment geht zudem hervor, daß selbst durch den reinen Waschvorgang ohne Be-

teiligung von Rinderserumalbumin die Rate beträchtlich erhöht wird.

2.4. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 2.3.

Die Analyse des Polypeptidmusters mit radioaktivem DCCD zeigt, daß unter Bedingungen, die eine 50-70%ige Hemmung des Elektronenflusses zur Folge haben, viele Proteine der Thylakoidmembran mit dem Carbodiimid eine kovalente Bindung eingehen. Die Identifizierung von Polypeptiden als mögliche Wirkorte des Inhibitors wird dadurch sehr erschwert. Aus der Vielzahl der markierten Banden in Abbildung 8 treten jedoch zwei mit einem Molekulargewicht von 19 und 20kD deutlicher hervor als andere und könnten potentiell an der Elektronentransporthemmung beteiligt sein.

Mehr Aufschluß über die Hemmstelle wurde von der Arbeit mit Mutanten erwartet. Im Verlauf der Untersuchungen mit Gerstenmutanten stellte sich heraus, daß der Elektronenfluß der Mutante xantha-1[35] auf der Basis gleicher Chlorophyll-Konzentrationen im Gegensatz zum Wildtyp praktisch nicht durch DCCD gehemmt werden kann (Abb.9) bei der Verwendung gleicher Proteinmengen im Reaktionsansatz aber eine vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber dem Hemmstoff aufweist (Abb.10).

Diese Resultate zeigen einen deutlichen Einfluß von Protein auf die Hemmwirkung von DCCD. Das daraufhin verwendete Fremdprotein Rinderserumalbumin ist ebenfalls in der Lage, die DCCD-Hemmung in Spinatchloroplasten weitgehend aufzuheben. Selbst nach verlängerter Einwirkungszeit des Inhibitors kann dieser Effekt beobachtet werden. Eine Aufhebung der Hemmung trotz kovalent gebundenen

DCCD's durch eine von RSA induzierte Konformationsänderung der Membran kann ausgeschlossen werden, da nach Entfernen des Albumins die Inhibierung nicht wieder einsetzt, sondern im Gegenteil noch weiter aufgehoben wird.

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit zu der in Kapitel 2.2. dargestellten Protonenkanalhypothese und die nach den letzten Befunden wahrscheinlichere Interpretation ist eine nicht kovalente Wechselwirkung zwischen Thylakoidmembran und Carbodiimid. Es bleibt festzuhalten, daß DCCD den entkoppelten photosynthetischen Elektronentransport primär auf Seiten der Plastochinon-Reduktion und erst in höheren Konzentrationen die Oxidation des Plastochinols beeinflußt. Dabei scheint, wie aus den Experimenten mit den Photosystem II-Akzeptoren Phenylendiamin und dem Benzochinon DMMDBQ hervorgeht, eine Beeinflussung des Protonentransfers in der Plastochinon-Region in einer anderen als der zunächst vermuteten kovalenten Interaktionsform nicht ausgeschlossen.

3. Identifizierung eines Proteinanteils im Bereich der Plastochinon-Reduktion mit Hilfe eines radioaktiv markierten Arylazids

3.1. Photolabel als Mittel zur Identifizierung von Polypeptiden der Thylakoidmembran

Die in der Lipidphase der Thylakoidmembran gelösten Plastochinon-Moleküle übertragen Elektronen und Protonen vektoriell über die Membran. Neben diesem Plastochinon-pool nimmt man zwei spezielle PQ-Spezies auf der reduzierenden Seite von Photosystem II an. Der von Duysens Q genannte Photosystem II-Primärakzeptor (Duysens und Sweers, 1963) und der von Bouges-Bouquet (1973) bzw. Velthuys und Amesz (1974) entdeckte sekundäre Akzeptor B (bzw.R) sind Plastochinone, die sich von denen des eigentlichen pools unterscheiden. Als Ein-Elektronen-Akzeptor wird Q durch die zweite Lichtreaktion nur zum Semichinon-Radikal reduziert (van Gorkom, 1974; Knaff et al, 1977) und überträgt in zwei Schritten Elektronen auf B, das schließlich als B^{2-} zwei Elektronen und zwei Protonen aus dem Matrixraum an den eigentlichen PQ-pool weiterleitet. Dieser letzte Schritt der Protonenaufnahme erfolgt relativ zum Elektronentransfer verzögert. Schliephake et al (1968) und Ausländer und Junge (1974) beobachteten, daß unter bestimmten Bedingungen wie Zerreiben der Chloroplasten mit Sand, Detergentien-Behandlung oder Anwesenheit bestimmter Entkoppler die Rate der Protonenaufnahme beschleunigt wird. Sie schlossen daraus auf ein "Schild", das die Redoxcarrier von der wäßrigen Matrixphase abschirmt und eine Diffusionsbarriere für Protonen bildet. Dieses Schild wird durch die oben erwähnten Bedingungen verändert oder umgangen, so daß Protonen leichter aufgenommen werden können.

Kurzzeitige Behandlung der Thylakoidmembran mit Trypsin zeigte schon sehr früh, daß Photosystem II-abhängige Reaktionen durch die Protease inhibiert werden (Selman und Bannister, 1971). Neben Auswirkungen auf den Kopplungsfaktor, die Fd-NADP-Oxidoreduktase, den Light-harvesting-Komplex und das Wasserspaltungssystem (vergl. Trebst, 1980) führt eine sehr milde, kurzzeitige Proteolyse zu Photosystem II-Reaktionen, die mit Fecy als Akzeptor DCMU-unempfindlich sind (Regitz und Ohad, 1976; Renger, 1976). Der Elektronentransport von Wasser zu Methylviologen wird unterbrochen (Trebst, 1979), während Photosystem I-abhängige Reaktionen mit Durohydrochinon oder Diaminodurol als Donatoren und Methylviologen als Akzeptor zunächst unbeeinflußt bleiben (Oettmeier et al, 1981). Die bereits erwähnte Protonenaufnahme wird durch die Proteolyse ebenfalls beschleunigt (Renger, 1977).

Trypsin als relativ großes, wasserlösliches Enzym erreicht nur die Außenseite der Thylakoidmembran (Regitz und Ohad, 1976) und verändert daher nur Oberflächen-exponierte Proteine. Die Interpretation der Befunde mit trypsinierten Chloroplasten führte zu der Vorstellung einer für den photosynthetischen Elektronentransport essentiellen, der Matrixseite zugewandten Proteinkomponente, von Renger (1976) "proteinaceous shield" genannt. Das Protein trennt die lipophilen Redoxcarrier Q und B von der wäßrigen Phase und hat die Funktion einer Q-PQ-Oxidoreduktase (Trebst und Draber, 1979; Pfister et al, 1979). Eine genauere Charakterisierung dieses Membranenzyms steht noch aus. Es besitzt eine Eigenschaft, die es ermöglicht, die Komponente unter den zahlreichen Polypeptiden der Thylakoidmembran zu identifizieren: als Bindestelle für viele Herbizide läßt es sich mit spezifisch wirkenden, radioaktiv markierten Hemmstoffen unter den Membranproteinen dann auffinden, wenn die Inhibitoren kovalent binden.

Zwei Gruppen von Hemmstoffen binden an das Protein und blockieren den Elektronenfluß zwischen Q und B (Trebst und Draber, 1979). Die Gruppe der DCMU-Typ-Herbizide (z.B. DCMU, Atrazin) besitzt das gemeinsame Strukturelement HN–C(=X)=X (mit X = N oder O), die andere Gruppe besteht aus substituierten Phenolen (z.B. Ioxynil, Dinoseb).

Werden Chloroplasten mit einem radioaktiv markierten Hemmstoff aus einer der beiden Gruppen inkubiert und anschließend ein nicht markierter Inhibitor aus der anderen Gruppe zugegeben, so findet sich die dem vorgelegten Hemmstoff zuzuordnende Radioaktivität nach Zentrifugation der Thylakoide im Überstand. Der nicht markierte Inhibitor hat die markierte Substanz verdrängt. Diese von Tischer und Strotmann (1977) für Chloroplasten eingeführte Verdrängungstechnik führte zunächst zu der Annahme, daß DCMU-Typ- und Phenol-Herbizide identische Bindungsstellen besitzen (Reimer et al, 1979). Weitergehende Untersuchungen (Oettmeier und Masson, 1980) bestätigten die gegenseitige Verdrängung beider Hemmstoffgruppen, weisen aber nicht auf identische, sondern sich gegenseitig beeinflussende, räumlich getrennte Wirkorte hin.

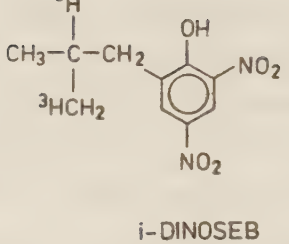
Aus den Verdrängungsexperimenten geht auch deutlich hervor, daß die Inhibitoren nicht kovalent an ihren Wirkort binden. Voraussetzung für eine Identifizierung des Rezeptors mit Hilfe der Gelelektrophorese ist aber eine kovalente Wechselwirkung zwischen Herbizid und Rezeptor. Bei reversibler Bindung des markierten Inhibitors würde durch SDS-Solubilisierung und Elektrophorese mit allen anschließenden Schritten wie Fixierung, Färbung und Entfärbung die Markierung mit Sicherheit entfernt und das Protein wäre nicht aufzufinden.

Als Lösung dieses Problems bietet sich die Umwandlung eines geeigneten Hemmstoffes in ein sogenanntes "Photolabel" an. Photolabel werden durch Belichtung zu hochreaktiven Substanzen und binden dann relativ unspezifisch an ihre nächste Umgebung. Die am häufigsten verwendeten Photolabel sind Arylazide. Bei Photolyse dieser Substanzklasse entstehen Arylnitrene, die innerhalb ihrer relativ kurzen Lebenszeit (0,1-1 ms; Reiser et al, 1968) entweder mit C-C-Doppelbindungen zu Aziridinen oder durch Insertion in C-H-Bindungen zu sekundären Arylaminen reagieren. Eine Reihe weiterer Reaktionsmöglichkeiten, darunter auch nicht photochemische und Reaktionen der Photolabel miteinander, sind wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung (für eine Übersicht vergleiche Staros, 1980).

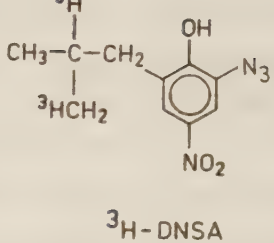
Kürzlich gelang in unserer Arbeitsgruppe die Umwandlung eines radioaktiv markierten Inhibitors in ein Azid, das die gleiche Hemmcharakteristik zeigt wie das bekannte Phenolherbizid Dinoseb. Es handelt sich um 4-Nitro-2-azido-6-(2',3'-^{3}H)isobutylphenol (^{3}H-DNSA), ein Hemmstoff der Plastochinon-Reduktion.

3.2. ^{3}H-DNSA-markierte Polypeptide der Thylakoidmembran

4-Nitro-2-azido-6-isobutylphenol ist ein guter Hemmstoff, der die entkoppelte photosynthetische NADP-Reduktion in einer Konzentration von 2 µM zu 50% hemmt. Diese Substanz ist damit ein etwas besserer Inhibitor als 2,4-Dinitro-6-isobutylphenol (i-Dinoseb), ein Isomeres von Dinoseb und Vorstufe für die Synthese des Azid-Derivates (Oettmeier et al, 1980). Abbildung 13 zeigt beide Inhibitoren im Vergleich.



i-DINOSEB



^3H-DNSA

Abb.13: 2,4-Dinitro-6-(2',3'-^{3}H)isobutylphenol (i-Dinoseb) und das Photolabel 4-Nitro-2-azido-6-(2',3'-^{3}H)isobutylphenol (^{3}H-DNSA)

Mit der im Abschnitt "Material und Methoden" beschriebenen sehr starken Lichtquelle zerfällt das Azid innerhalb von 10-15 min. Das geht hervor aus dem Verschwinden des Absorptionsmaximums bei 437 nm. Entsprechend wurden Spinatthylakoide in Gegenwart von 5 nMolen ^{3}H-DNSA 15 min lang belichtet. Zur Entfernung von nicht gebundenem Azid und Carboxydismutase wurden die Membranen zwei- bis dreimal gewaschen und dann mit SDS solubilisiert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese mit nachfolgender Fixierung, Färbung und Entfärbung. Nach Aufnahme eines Densitogramms wurde der Gelstreifen in Stücke zerschnitten und die Radioaktivität in jedem Stück bestimmt (siehe Material und Methoden). Densitogramm und Markierungsmuster zeigt Abbildung 14. Der Hauptanteil der Radioaktivität ist im Bereich der freien Pigmente am Gelende zu finden. Da eine Besonderheit der Chloroplastenlipide ihr hoher Gehalt an ungesättigten Fettsäuren (vor allem Linolensäure, die 48-70% aller Fettsäuren ausmacht; Wolf et al, 1962; Debuch, 1962) ist und DNSA einen hohen, unspezifischen Bindungsanteil besitzt (Oettmeier und Masson, 1980),

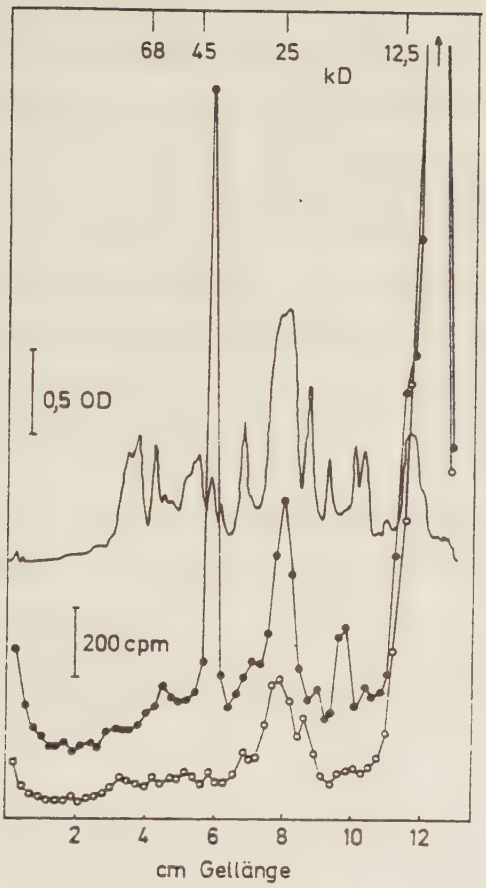


Abb.14: Densitogramm und Verteilung der Radioaktivität (●——●) von Thylakoidproteinen, die in Gegenwart von 5 nMolen ^{3}H-DNSA/mg Chl 15 min belichtet und in einem 11-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurden.
Die Verteilung der Radioaktivität der mit 50 nMolen i-Dinoseb vorinkubierten und anschließend mit 5 nMolen ^{3}H-DNSA/mg Chl belichteten Probe ist ebenfalls gezeigt (o——o).
Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Material und Methoden beschrieben

kann man dieses Ergebnis erwarten. Die Chlorophyll-Protein-Bande ($Chl_{a/b}$-P2; vergleiche Abb.2) enthält ebenfalls Lipide und ist vermutlich deshalb markiert.

Die Vorinkubation der Thylakoide mit i-Dinoseb führt ganz spezifisch zum Verlust zweier Radioaktivitätsmaxima im Molekulargewichtsbereich von 40kD und 16kD (Abb.14). Wenn DNSA als Vertreter der Phenolherbizide und DCMU sich gegenseitig verdrängen, sollten bei Vorgabe von DCMU die in Frage kommenden Polypeptide ebenfalls geringer markiert sein. Ein solcher Versuch mit steigenden Mengen DCMU (Abbildung 15) zeigt deutlich, daß die Radioaktivitätsmaxima in jenem Molekulargewichtsbereich deutlich geringer werden. Die Markierung im Chlorophyll-Protein bleibt wieder unbeeinflußt.

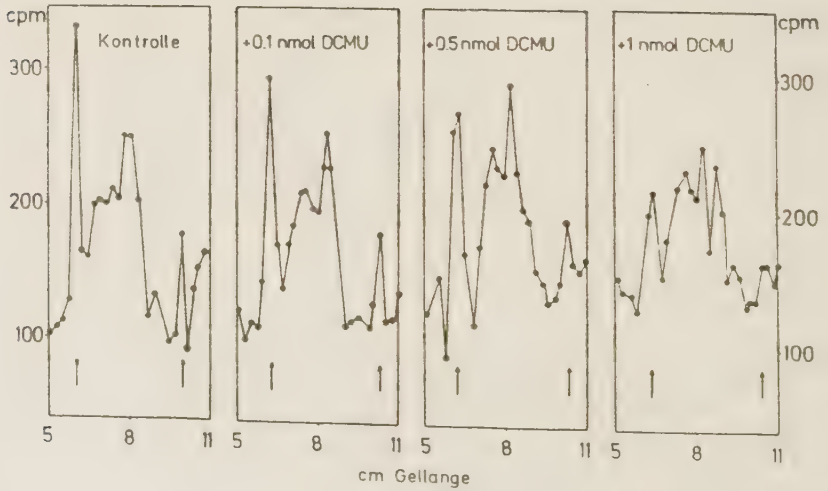


Abb.15: Verteilung der Radioaktivität in Thylakoiden, die in Gegenwart steigender Mengen DCMU jeweils mit 8 nMolen ^{3}H-DNSA/mg Chl belichtet und wie in Abb.14 elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Gezeigt ist nur ein Gelausschnitt, der die Abnahme der Radioaktivität im 40 und 16kD-Peptid (Pfeile) deutlich zeigt.

3.3. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 3.

4-Nitro-2-azido-6-isobutylphenol (DNSA) gehört zur Gruppe der Phenolherbizide, die wie Hemmstoffe des DCMU-Typs die Reduktion des Plastochinons durch den Photosystem II-Primärakzeptor Q verhindern. Wirkort dieser Substanzen ist ein Protein auf der Matrixseite der Thylakoidmembran, das als Redoxüberträger ein spezielles (gebundenes?) Plastochinon enthält. Nach derzeitiger Vorstellung erniedrigen die an das Protein gebundenen Herbizide das Redoxpotential von B, das als Redoxcarrier zwischen dem tief in die Membran eingebetteten Q und dem eigentlichen Plastochinon-pool steht. Dem Herbizidbindungsprotein (B-Protein) wird die Funktion einer Q-PQ-Oxidoreduktase zugeordnet. Der Nachweis, daß es sich bei der Herbizidbindungsstelle tatsächlich um ein Protein handelt, ergab sich aus Experimenten mit der Protease Trypsin: kurzzeitige Trypsin-Behandlung der Thylakoidmembran führt zum Verlust der Bindungsstelle (Oettmeier und Masson, 1980; Trebst, 1979).

Alle bisher verwendeten Techniken wie Trypsin-Verdauung, Verdrängung eines radioaktiv markierten Hemmstoffes durch andere Inhibitoren, Bestimmung der Bindungskonstanten und Anzahl der Bindungsstellen einer ganzen Reihe von Hemmstoffen haben viel zur Charakterisierung des B-Proteins beigetragen. Die Identifizierung oder sogar Isolierung des Proteins bereitete jedoch Schwierigkeiten, da vorerst nur Inhibitoren Zugang zu dieser Membrankomponente ermöglichen, diese aber trotz hoher Affinität zum Rezeptor keine kovalente Bindung eingehen. Behandlung mit Detergentien oder elektrophoretische Trennung der Polypeptide führen zur Dissoziation des Inhibitor-Rezeptor-Komplexes und damit zur Entfernung eines Labels.

Das Photolabel ^{3}H-DNSA aber bindet bei Belichtung kovalent an seinen Wirkort. Als Hemmstoff der Plastochinon-Reduktion sollte es vorzugsweise mit seiner Bindungsstelle reagieren und sie dadurch irreversibel markieren. Zwei Radioaktivitätsmaxima im 40kD- und 16kD-Bereich wurden nach elektrophoretischer Trennung der Membranproteine entdeckt, die durch Vorgabe des analog wirkenden i-Dinoseb verdrängt werden (Abb.14). Auch durch Vorinkubation mit DCMU, dessen Wirkort den der Phenolherbizide beeinflussen kann, werden beide Markierungen erniedrigt (Abb.15).

Kürzlich haben Pfister et al (1981) und Gardner(1981) gezeigt, daß das Photolabel und Triazin-Derivat Azido-Atrazin vorzugsweise ein 32-34kD Polypeptid und in geringerem Ausmaß ein 25 und 16kD Peptid radioaktiv markiert. Ein Peptid gleicher Größenordnung (32kD) geht Photosystem II-Partikeln verloren, die durch Trypsin-Behandlung ihre DCMU- bzw. Atrazin-Empfindlichkeit verloren haben (Croze et al, 1979; Mullet und Arntzen, 1981). Mutanten von Zea mays mit einem Defekt auf der reduzierenden Seite von Photosystem II fehlt ein 32kD-Protein (Leto und Miles, 1980) und Mattoo et al (1981) finden in Spirodela eine Trypsin-labile 32kD-Komponente, die in großen Mengen synthetisiert, aber gleichzeitig sehr schnell wieder metabolisiert wird.

Es fällt auf, daß diese Markierungsversuche bzw. die Versuche zur Hemmstoffempfindlichkeit mit Herbiziden des DCMU-Typs (DCMU und Atrazin) gemacht, die hier vorgestellten Ergebnisse aber mit einem Phenol-Hemmstoff erhalten wurden. Trotz gleichartiger Wirkungsweise beider Inhibitorgruppen in Bezug auf die Hemmung der Reaktion $Q^{-}B \longrightarrow QB^{-}$ und trotz gegenseitiger Verdrängung von der Membran

unterscheiden sie sich in wichtigen Punkten. Während sich DCMU-analoge Verbindungen und Phenole jeweils untereinander kompetitiv verdrängen, zeigt die Verdrängung der einen Gruppe durch die andere einen eindeutig nichtkompetitiven Effekt (Oettmeier und Masson, 1980). Zudem, wie von Oettmeier und Masson ebenfalls gezeigt, ändert sich nach Trypsin-Behandlung der Thylakoide die Bindungskonstante der DCMU-Herbizide, die der Phenole aber bleibt unverändert. Weiterhin sind Chloroplasten aus Atrazin-resistenten Pflanzen nicht mehr in der Lage, das DCMU-Typ-Herbizid Atrazin zu binden, werden aber im Vergleich zum Wildtyp bereits durch geringere Konzentrationen an Phenolherbiziden (DNOC, Ioxynil oder Bromnitrothymol) inhibiert (Pfister und Arntzen, 1979; Oettmeier et al, in Vorbereitung).

Diese Ergebnisse führten zu dem Konzept eines für beide Herbizidgruppen gemeinsamen Proteins, das verschiedenartige Hemmstoffe an unterschiedlichen Stellen bindet. Die nichtkompetitive Verdrängung von DCMU-Herbiziden durch Phenole würde nach diesem Modell auf einer allosterischen Wechselwirkung beruhen, durch die die Konformation der Gesamtstruktur des Proteins verändert wird und ein vorgelegter Inhibitor die Affinität zu seiner Bindungsstelle verliert. Das Auftreten von Atrazin-resistenten Pflanzen könnte zum Beispiel Folge einer Mutation sein, die die Veränderung der Aminosäuresequenz einer Bindungsstelle auf Grund eines entsprechenden Selektionsdruckes bewirkt.

Unter diesen Aspekten wird das Auftreten zweier verschiedener Polypeptide erklärbar. Die Aufmerksamkeit konzentriert sich zur Zeit auf das 32kD und das 40kD Polypeptid, weil beide mit den ent-

sprechenden Photolabeln bevorzugt markiert werden. Die Funktion des 16kD Proteins ist unklar, könnte aber strukturell sowohl mit dem 32kD als auch mit dem 40kD Peptid in Zusammenhang stehen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse geben zusammen mit den Befunden anderer Autoren Hinweise auf zwei verschiedene Polypeptide, die jeweils unterschiedliche Hemmstoffgruppen binden können. Um mehr Klarheit über die Struktur des Herbizidbindungsproteins zu bekommen, wurden Photosystem II-Partikel isoliert und deren Hemmstoffempfindlichkeit und Proteinzusammensetzung untersucht. Die Experimente dazu sind im folgenden Kapitel beschrieben.

4. Einfluß verschiedener Hemmstoffe der Plastochinon-Reduktion auf teilweise gereinigte Photosystem II-Partikel

4.1. Hemmstoffempfindlichkeit von Photosystem II-Partikeln

Die Kenntnis über die Wirkung von Inhibitoren auf Teilbereiche des Elektronentransportsystems ist dann von Bedeutung, wenn die Rezeptoren jener Hemmstoffe isoliert werden sollen. Da das die DCMU- und Phenolherbizid-bindende Protein wahrscheinlich Teil des PS II-Komplexes ist oder zumindest in enger Nachbarschaft zu diesem steht, bietet sich als erster Schritt in Richtung Rezeptorisolierung die Präparation eines noch funktionstüchtigen PS II-Komplexes an. Es sind in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben, um Photosystem II von anderen Membrankomponenten, vor allem Photosystem I und dem Light-harvesting-Komplex, zu trennen. Neben der Fraktionierung von Thylakoiden mit Hilfe von Ultraschall (Jakobi und Lehmann, 1968) oder Druck (Sane et al, 1970) war die Verwendung von Detergentien wie Triton (Vernon et al, 1971) oder Digitonin (Anderson und Boardman, 1966; Wessels et al, 1973) erfolgreich. Vor kurzem ist von Satoh (1979) die Präparation eines PS II-Pigment-Protein-Komplexes beschrieben worden, der auf SDS-Polyacrylamid-Gelen neben freiem Pigment nur noch zwei Proteinbanden zeigt. Der Komplex ist photochemisch aktiv, das heißt, er reduziert im Licht Dichlorphenol-indophenol (DCIP). Da im allgemeinen während der Isolierung mit Detergentien das Wasserspaltungssystem inaktiv wird, muß dem Reaktionsmedium ein künstlicher Elektronendonor wie Diphenylcarbazid (DPC) zugesetzt werden.

Über die Hemmstoffempfindlichkeit von PS II-Präparationen gab es bisher keine eingehenden Untersuchungen. Wessels et al (1973) be-

richten, daß die DCIP-Reduktion ihrer Digitonin-PS II-Partikel bei 20 uM DCMU zu 70% gehemmt sind. Croze et al (1979) isolierten Triton-PS II-Partikel, deren photosynthetische Aktivität durch 10 uM DCMU zu 55-70% inhibiert wird. Das sind vergleichsweise hohe Hemmstoffkonzentrationen, wenn man bedenkt, daß in intakten Thylakoiden der I_{50} von DCMU bei etwa 0,05 µM liegt.

Um die Empfindlichkeit von PS II-Partikeln gegenüber verschiedenartigen Inhibitoren zu untersuchen, war zunächst die Reduktion der Membranproteine auf die von Satoh beschriebenen zwei Komponenten nicht erforderlich. Das Isolierungsverfahren von Satoh beinhaltet in Anlehnung an die Photosystem II-Präparationen von Wessels et al (1973) und Huzisige et al (1969) folgende Schritte: (1) EDTA-Behandlung der Thylakoide, (2) zweimalige Digitonin-Behandlung, (3) Dichtegradientenzentrifugation, (4) Chromatographie auf DEAE-Zellulose und (5) isoelektrische Fokussierung. Die in Material u. Method beschriebene Präparation verzichtet auf die beiden letzten Schritte. Auch die EDTA-Behandlung zur Entfernung des Kopplungsfaktors (McCarty, 1971) wurde ausgelassen, da hierdurch bereits nach dem ersten Schritt bis zu 50% der PS II-Aktivität verloren geht (Satoh, 1979).

Abbildung 16 zeigt schematisch die Auftrennung Digitonin-behandelter Chloroplasten nach 40stündiger Zentrifugation bei 100 000g im 10-30%igen Saccharose-Gradienten. Neben drei grünen Banden, von Wessels FI, FII und FIII genannt, erscheint eine rötlich-braune Bande zwischen FIII und FII, die die Cytochrome f und b_6 enthält. Auf Grund ihrer photochemischen Aktivität und Pigmentzusammensetzung sind die Banden FIII und FI angereichertes Chlorophyll a/b-Protein (Light-harvesting-Komplex) bzw. Photosystem I-Partikel.

Fraktion	Chl a/b	µMole DCIP/mg x h
F III	1,6	0
	1,7	22
F II	2,6	112
F I	3,2	38

Abb.16: Auftrennung Digitonin-behandelter Chloroplasten im 10-30% Saccharose-Gradienten nach 40stündiger Zentrifugation bei 100 000g. Die photosynthetische Aktivität der einzelnen Banden wurde mit DPC als Elektronendonor und DCIP als Akzeptor gemessen.

Das Reaktionsgemisch enthielt in 1ml: 2,5 µg Chl; DCIP 50 µM; MES-NaOH pH 6,0 30mM; $MgCl_2$ 3mM; DPC 1,5mM

FII dagegen enthält im wesentlichen das Reaktionszentrum von Photosystem II und zeigt eine entsprechend hohe Aktivität (Abb.16).

Die Empfindlichkeit dieser Photosystem II-Aktivität gegenüber Herbiziden des DCMU- und Phenol-Typs geht aus Abbildung 17 hervor. Das Triazin-Derivat Atrazin hemmt den Elektronenfluß von DPC zu DCIP in einer Konzentration von 10µM zu 25%. DCMU ist ein etwas besserer Hemmstoff. 10µM DCMU führt zu 50%iger Hemmung. Diese Befunde stehen in Einklang mit den Untersuchungen von Croze et al (1979), deren Triton-PS II-Partikel eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber DCMU aufwiesen. Wesentlich sensitiver dagegen ist die Aktivität gegenüber Phenolherbiziden. Der I_{50} für i-Dinoseb liegt bei 2,5µM, für Bromnitrothymol bei 1,4µM und für 2-Jod-4-nitro-6-isobutylphenol (DNSJ) bei etwa 0,5µM (Tabelle 2).

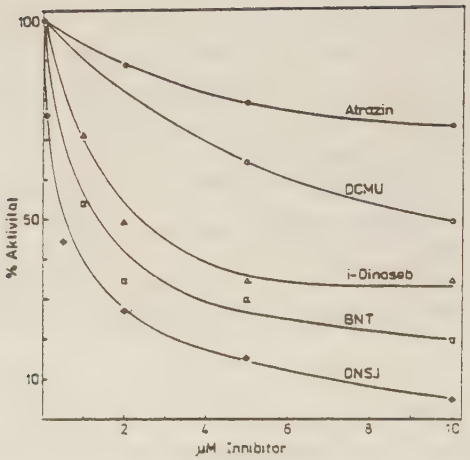


Abb.17: Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf den Elektronenfluß von DPC zu DCIP in PS II-Partikeln mit geringem Fremdproteinanteil.

DCMU-Typ-Herbizide: DCMU, Atrazin; Phenol-Herbizide: BNT (Bromnitrothymol), DNSJ (2-Jod-4-nitro-6-isobutylphenol, i-Dinoseb. Die Kontrollrate betrug 47 µMole DCIP/mg Chl/h. Der Reaktionsansatz entsprach dem von Abb.16

Tabelle 2: Vergleich der Hemmstoffempfindlichkeiten von unfragmentierten Thylakoiden und PS II-Partikeln mit geringem Fremdproteinanteil

	I_{50} [µM]	
	unfragmentierte Thylakoide	PS II Partikel
DCMU-Typ-Herbizide:		
DCMU	0,05 [a]	10
Atrazin	0,35 [c]	>10
Phenol-Herbizide:		
i-Dinoseb	3 [b]	2,5
DNSJ	0,2 [c]	0,5
BNT	0,08 [a]	1,4

Zu Tabelle 2: Der I_{50}-Wert gibt diejenige Konzentration an, die den Elektronentransport zu 50% hemmt. Die I_{50}-Werte für die PS II-Partikel sind der Abb.17 entnommen und gelten für die Reaktion DPC ⟶ DCIP. Die Werte für unfragmentierte Chloroplasten sind folgenden Quellen entnommen: a) Trebst, 1979; b) Oettmeier und Masson, 1980; c) Oettmeier, persönl. Mitteilung

Im Gegensatz zu Atrazin und DCMU hat sich die Empfindlichkeit gegenüber den Phenolherbiziden im Vergleich mit intakten Thylakoiden in den Partikeln in weit geringerem Maße verändert.

Das Polypeptidmuster der Fraktion FII in Abbildung 18 zeigt bemerkenswert wenig Banden. Zwei sehr stark hervortretende Peptide mit einem Molekulargewicht von 64kD und 55kD sind wahrscheinlich die α- und β-Untereinheiten des Kopplungsfaktors, der zu Beginn der Präparation nicht durch EDTA-Behandlung entfernt wurde und nun den Hauptteil der Proteinmenge ausmacht. Drei weitere, wesentlich schwächere Banden mit Molekulargewichten von 40, 33 und 27kD sind erkennbar (Pfeile). Das 40 und 27kD Protein sind wahrscheinlich Bestandteil des von Satoh beschriebenen PS II-Pigment-Protein-Komplexes, der aus einem 43 und 27kD Polypeptid besteht.

Abbildung 18 zeigt außerdem noch das Markierungsmuster der PS II-Partikel, die vor der Elektrophorese in Gegenwart des Photolabels ^{3}H-DNSA (siehe Kapitel 3.) 15 min lang belichtet wurden. Eine zweite Probe war den gleichen Bedingungen unterworfen, enthielt aber zusätzlich vor der Belichtung i-Dinoseb. Das Radioaktivitätsmaximum stimmt ungefähr überein mit der als β-Untereinheit angesprochenen Bande, obwohl der Peak einem Protein mit etwas höherer Mobilität zugeordnet werden könnte. Das mag an einer nicht völlig exakten Anpassung beider Kurven aneinander liegen, könnte aber

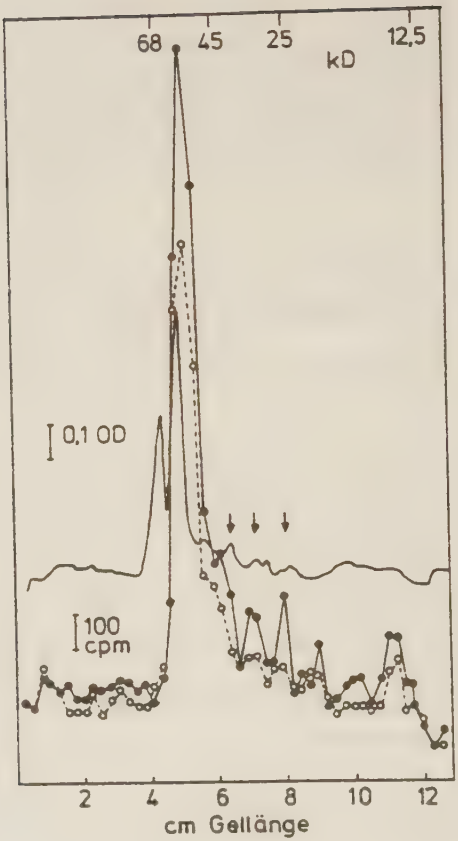


Abb.18: Densitogramm und Verteilung der Radioaktivität von PS II-Partikeln, die in einem 11-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurden. Die Partikel wurden in Abwesenheit (●———●) und Gegenwart (o———o) von 20 nMolen i-Dinoseb mit je 3,4 nMolen ^{3}H-DNSA/25µg Chl (0,5ml) belichtet. Die Pfeile deuten auf die schwachen, aber auf dem Gel noc sichtbaren Banden

auch ein von der Untereinheit überlagertes Polypeptid sein. Die α-Untereinheit enthält keine Radioaktivität. Die drei anderen Peptide sind radioaktiv markiert, jedoch nicht in Gegenwart von i-Dinoseb. Das Protein im Bereich der β-Untereinheit bindet auch in Gegenwart von i-Dinoseb noch relativ viel DNSA.

4.2. Einfluß von Trypsin auf die Hemmstoffempfindlichkeit von Photosystem II-Partikeln

Trypsin-Behandlung vermindert nicht nur die Hemmstoffempfindlichkeit intakter Thylakoide, sondern auch, wie von Croze et al (1979) für DCMU nachgewiesen, die von PS II-Partikeln. Wie bei den Triton-Partikeln von Croze wird die Hemmung der DCIP-Reduktion durch DCMU in den Digitonin-PS II-Partikeln durch Protease-Wirkung aufgehoben (Abbildung 19). Nach 20min Trypsin-Inkubation sind 90% der Kontrollrate erreicht, während zu Beginn der Proteolyse die Hemmung noch 50-55% betrug. Abgesehen von einer leichten Aufhebung der Hemmung in den ersten 10min setzt die eigentliche Wirkung in den darauffolgenden Minuten ein und scheint nach insgesamt 2omin abgeschlossen zu sein.

Anders verhält sich das Phenolherbizid i-Dinoseb (Abbildung 19). Die Trypsin-Behandlung steigert zunächst die Wirkung des Inhibitors, hebt dann aber die Hemmung nach 15min auf. Allerdings ist die Rate nach 20-30min Proteolyse immer noch zu 40% inhibiert.

Während die Aufhebung der Hemmung durch DCMU nach 10min einsetzt, ist dieser Effekt bei der Phenol-Hemmung erst 5min später zu bemerken.

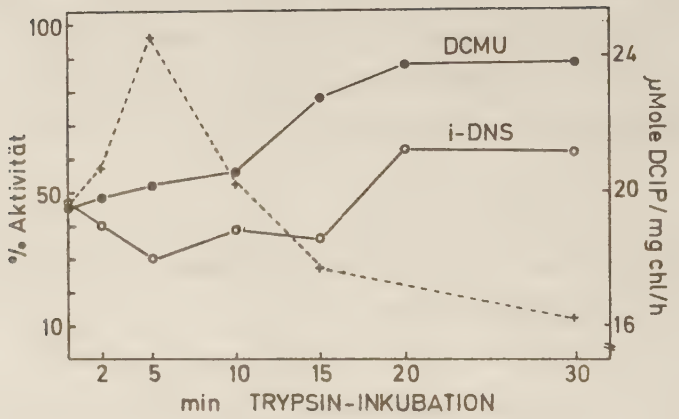


Abb.19: Einfluß von Trypsin auf die durch DCMU bzw. i-Dinoseb (i-DNS) gehemmte Elektronentransportrate (DPC ⟶ DCIP) von PS II-Partikeln mit hohem Fremdproteinanteil. Die gestrichelte Linie zeigt die Abhängigkeit der Kontrollrate von der Enzymeinwirkung (rechte Ordinate).

Der Inkubationsansatz enthielt in 0,6ml: PS II-Partikel mit einer Chl-Konzentration von 75µg; Trypsin 200µg; Tricin-NaOH pH8,0 40mM; $MgCl_2$ 4mM; Digitonin 0,3% (w/v); Saccharose ca. 20% (w/v).
Die Inkubation bei 20°C wurde nach den angegebenen Zeiten durch Zugabe von 400µg Trypsin-Inhibitor gestoppt und ein Aliquot (100µl) in den Reaktionsansatz (siehe Abb.16) pipettiert, der mit Ausnahme der Kontrolle entweder 3µM DCMU oder 3µM i-Dinoseb enthielt

Wie aus Abbildung 19 weiter hervorgeht, ist in den ersten 10min der Enzyminkubation die Rate der DCIP-Reduktion erhöht und wird erst später niedriger als die Kontrollrate. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist eine verbesserte Zugänglichkeit des Akzeptors zu seinem Reduktionsort zu Beginn der Proteolyse.

Abbildung 20 zeigt noch einmal die Abhängigkeit unbehandelter und 20min mit Trypsin inkubierter PS II-Partikel gegenüber steigenden Hemmstoffkonzentrationen. Besonders deutlich ist die Aufhebung der DCMU-Hemmung zu erkennen. Der prozentuale Unterschied zwischen Kontrolle und trypsinbehandelten Partikeln beträgt bei einer Konzentration von 4µM DCMU etwa 50%, bei dem Phenolherbizid DNSJ 55%, beim i-Dinoseb nur 25%.

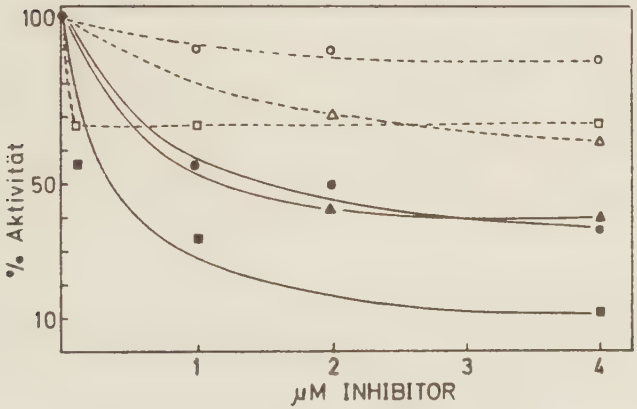


Abb.20: Einfluß steigender Hemmstoffkonzentrationen auf unbehandelte PS II-Partikel (durchgezogene Linien)und auf 20min mit Trypsin inkubierten Partikeln (gestrichelte Linien).

■——■ (□——□) DNSJ; ▲——▲ (△——△) i-Dinoseb

●——● (○——○) DCMU

Inkubations- und Reaktionsbedingungen entsprechen denen von Abb.19

Zu den Trypsin-Experimenten ist zu bemerken, daß eine andere Photosystem II-Präparation als in Kapitel 4.1. verwendet wurde. Die Partikel im Trypsin-Versuch waren empfindlicher gegenüber DCMU (vergleiche Abb.20). Das Polypeptidmuster zeigt im Gegensatz zu Abbildung 18 wesentlich mehr Proteinbanden (Abbildung 21).

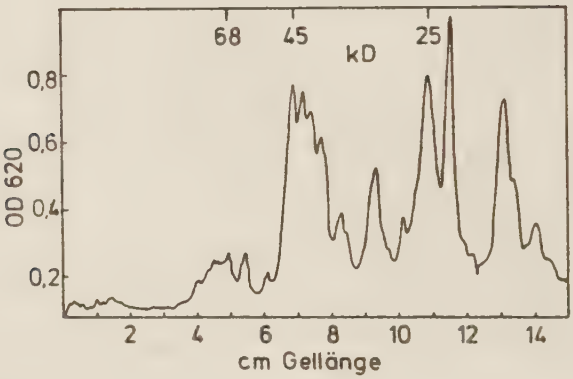


Abb.21: Densitogramm von PS II-Partikeln mit hohem Fremdproteinanteil. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 11-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel

Der Grund für die unterschiedlichen Präparationen lag wahrscheinlich in der Verwendung einer anderen Digitonin-Charge (Digitonin von Serva anstatt von Merck), die sich in ihrer Wasserlöslichkeit von der in Kapitel 4.1. verwendeten Substanz beträchtlich unterschied und die Ausbeute in den verschiedenen Stadien der Präparation veränderte.

4.3. Diskussion der Ergebnisse von Kapitel 4.

DCMU-Typ- und Phenol-Herbizide hemmen den photosynthetischen Elektronentransport auf der reduzierenden Seite von Photosystem II. Sie verdrängen sich in nichtkompetitiver Weise gegenseitig von der Thylakoidmembran (Oettmeier und Masson, 1980). Zahlreiche Untersuchungen zeigen, daß DCMU-Hemmstoffe vorzugsweise in Wechselwirkung mit einem 32kD Polypeptid treten (Croze et al, 1979; Leto und Miles, 1980; Pfister et al, 1981; Gardner, 1981; Mullet und Arntzen, 1981; Mattoo et al, 1981), Phenole aber, wie in Kapitel 3. beschrieben, bevorzugt mit einem 40kD Protein reagieren.

Die Unterteilung des Herbizidbindungsproteins in zwei Untereinheiten mit je einer Bindungsstelle für DCMU- und phenolische Hemmstoffe kann diese Befunde zunächst am besten erklären. Mehr Information über die Zusammensetzung des Proteins sollten PS II-Partikel bringen, die ein im Gegensatz zur Thylakoidmembran weniger komplexes System darstellen. Digitonin-PS II-Partikel sind photosynthetisch aktiv, d.h. sie katalysieren lichtabhängig die Reduktion von DCIP, wenn ein künstlicher Elektronendonator wie DPC verwendet wird. Der Vergleich zwischen der Empfindlichkeit dieser Reaktion gegenüber beiden Herbizidgruppen und dem Polypeptidmuster der Partikel sollte den Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität aufzeigen.

Die Untersuchungen ergaben, daß die Phenolherbizide i-Dinoseb und 2-Jod-4-nitro-6-isobutylphenol (DNSJ) den Elektronentransport von DPC zu DCIP etwa in gleichen Konzentrationsbereichen wie den in unfragmentierten Thylakoiden hemmen. Hoch gereinigte PS II-Partikel erwiesen sich aber gegenüber Hemmstoffen des DCMU-Typs als

weniger empfindlich (Tab.2). Dagegen sind PS II-Präparationen mit einem hohen Anteil an Fremdproteinen gegenüber DCMU fast so empfindlich wie intakte Thylakoide (Abb.20).

Der Vergleich zwischen Partikeln mit hohem und geringem Fremdproteinanteil und das unterschiedliche Verhalten dieser Präparationen gegenüber DCMU weist darauf hin, daß in den hoch gereinigten Partikeln die Bindungsstelle für DCMU-Herbizide verlorengegangen ist. Eaglesham und Ellis (1974) berichten in einer Untersuchung über chloroplastencodierte Membranproteine von einem 32kD Protein (Peak D), das bei Solubilisierung der Membran mit Digitonin und anschließender Zentrifugation in den Überständen und nicht im PS II-Sediment (10 000g) oder PS I-Sediment (144 000g) angereichert ist. Bei der in Material und Methoden beschriebenen Präparation sind die PS II-Partikel nach der ersten Digitonin-Behandlung im 30 000g Sediment angereichert. Mit dem Überstand dieser Zentrifugation könnte das von Eaglesham und Ellis beschriebene Polypeptid verlorengegangen sein.

Die Vorstellung von der Zusammensetzung des Herbizidbindungsproteins aus zwei Untereinheiten wird unterstützt durch den Befund, daß relativ hoch gereinigte Partikel im Gegensatz zu Präparationen mit hohem Fremdproteinanteil eine drastisch verringerte DCMU-Empfindlichkeit, aber ein kaum verändertes Verhalten gegenüber Phenolen zeigen. Densitogramm und Radioaktivitätsmuster in Abbildung 18 lassen jedoch keine eindeutige Aussage über die Bindungsstelle von DNSA zu, da bis auf die α-Untereinheit des Kopplungsfaktors alle anderen Peptide markiert sind, diese Markierung aber auch durch i-Dinoseb verdrängt werden. Die von Satoh (1979)

als strukturelle und funktionelle Komponenten des PS II-Pigment-Protein-Komplexes beschriebenen Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 27 und 43kD könnten identisch mit den in Abbildung 18 gezeigten 27 und 40kD Peptiden sein.

Die Verminderung der Hemmstoffempfindlichkeit durch Trypsin-Verdauung beginnt im Vergleich zu DCMU bei den phenolischen Hemmstoffen i-Dinoseb und DNSJ (nicht gezeigt) zu einem späteren Zeitpunkt, nachdem zunächst die Sensitivität gegenüber i-Dinoseb erhöht wird (Abb.19). Steinback et al (1981) finden in Untersuchungen mit intakten Thylakoiden in den ersten Minuten der Trypsin-Behandlung eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den Phenolherbiziden Bromnitrothymol und Dinoseb und eine entsprechende zeitliche Verschiebung in der Aufhebung der Hemmung.

Ein bisher noch nicht erwähnter Unterschied zwischen den beiden Hemmstoffgruppen betrifft die zeitliche Verzögerung der Hemmwirkung (time lag), die bei Phenolen, nicht aber bei DCMU-Herbiziden an unfragmentierten Chloroplasten beobachtet wird (Reimer et al, 1979). Böger und Kunert (1979) berichten, daß diese Zeitverzögerung durch Trypsin-Behandlung aufgehoben wird, d.h. bei Zugabe des Inhibitors zum Reaktionsmedium setzt die Hemmung sofort ein. Offensichtlich müssen Phenole eine Barriere überwinden, ehe sie ihren Wirkort erreichen. Diese Barriere wird durch Proteolyse verändert, so daß zunächst die Bindungsstelle besser zugänglich, aber auch empfindlicher gegenüber Phenolherbiziden wird. Erst nach längerer Enzymeinwirkung geht auch die Hemmung durch Phenole teilweise verloren.

Die bevorzugte Markierung eines 40kD Peptids, die Verdrängung dieser Markierung durch DCMU bzw. i-Dinoseb, die unterschiedliche Empfindlichkeit der durch Photosystem II-Partikel katalysierten DCIP-Reduktion gegenüber Phenol- und DCMU-Typ-Herbiziden und schließlich das unterschiedliche Verhalten trypsinierter PS II-Partikel gegenüber beiden Hemmstoffgruppen unterstützen zusammen mit den Ergebnissen anderer Autoren ein Bild, das die Herbizid-bindungsstelle in zwei Untereinheiten teilt.

DISKUSSION

Die Redoxcarrier des photosynthetischen Elektronentransportsystems sind membrangebundene Komponenten, die den lichtabhängigen Elektronenfluß vom Wasser zum NADP ermöglichen und abwechselnd in protonenabhängigen und rein elektrogenen Schritten einen pH-Gradienten erzeugen, der zur Bildung von ATP aus ADP und P_a führt. Die für diese Vorgänge wichtige geordnete Struktur der Membran setzt sich neben Lipiden aus zahlreichen Proteinkomponenten zusammen, die zu einem großen Teil noch unbekannt sind. Bisher entwickelte Photosynthese-Schemata berücksichtigen fast ausschließlich die Redoxcarrier (vergl. Abb.1) und erst in letzter Zeit wird versucht, auch die Assoziation dieser Komponenten mit Proteinen darzustellen (von Wettstein, 1979; Trebst, 1980a).

In diesem Zusammenhang sind Proteine von besonderem Interesse, die am protonenabhängigen Redoxzyklus des Plastochinons beteiligt sind. Dieser Zyklus ist neben der Oxidation des Wassers der energiekonservierende Schritt zwischen den beiden Photosystemen. Die Oxidation des Plastohydrochinons erfolgt unter Freisetzung von Protonen auf der Innenseite der Thylakoidmembran durch den Cytochrom f/b_6-Komplex, der Elektronen über Plastocyanin auf das Reaktionszentrum von Photosystem I überträgt (Avron und Chance, 1966; Reinwald et al, 1968; Böhme und Cramer, 1972). Die Reduktion des Plastochinonpools durch den Photosystem II-Primärakzeptor Q wird katalysiert durch ein das spezielle Plastochinon B enthaltende Enzym Q-PQ-Oxidoreduktase (B-Protein) auf der Matrixseite der Thylakoidmembran (Trebst und Draber, 1979; Pfister et al, 1979).

Der genaue Mechanismus des Protonen- und Elektronentransfers durch

der Plastochinon-pool ist unklar. Die vorgeschlagenen Modelle (für eine Übersicht siehe Hauska und Trebst, 1977) reichen von der Vorstellung einer einfachen Diffusion der reduzierten und protonierten Plastochinone von der Membranaußen- zur innenseite, auf der die Protonen wieder freigesetzt und die Elektronen auf das Photosystem I-Reaktionszentrum weitergeleitet werden (Stiehl und Witt, 1969), über hypothetische Protonenpumpen (Siggel, 1975; 1976) bis hin zum Q-Zyklus, der die bisher nicht geklärte Funktion von Cytochrom b_{559} mit einbezieht (Mitchell, 1975).

Die Kenntnis der Plastochinon-Bindungsstellen kann dazu beitragen, die Plastochinon-Region in der Thylakoidmembran besser zu verstehen. Zur Zeit ist noch kein Plastochinon-label verfügbar, das kovalent mit seinen Bindestellen reagieren kann. Dagegen gibt es eine Reihe von Substanzen, die Oxidation und Reduktion des Plastochinon-pools spezifisch inhibieren und die Möglichkeit bieten, durch geeignete Hemmstoffe beteiligte Komponenten zu identifizieren.

Hemmstoffe wie DBMIB oder DNP-INT inhibieren zum Beispiel in niedrigen Konzentrationen die Plastochinon-Oxidation, höhere Konzentrationen beeinflussen aber auch die Reduktion des Chinon-pools (vergl. Trebst, 1980). DCMU als bekanntester Vertreter einer Hemmstoffgruppe, der das Strukturelement HN-C=X (X = N oder O) gemeinsam ist, hemmt spezifisch den Elektronenübergang zwischen den beiden Plastochinonen Q und B durch Erniedrigung des Redoxpotentials von B (Velthuys und Amesz, 1974). Zu dieser Gruppe der DCMU-Typ-Herbizide gehören neben DCMU zum Beispiel noch das Triazin Atrazin und das Triazinon Metribuzin. Im Gegensatz dazu stehen phenolische Hemmstoffe, denen das oben genannte Strukturelement fehlt, die aber ebenfalls die Plastochinon-Reduktion in-

hibieren. Vertreter dieser Gruppe sind zum Beispiel Ioxynil, Dinoseb, i-Dinoseb oder Bromnitrothymol.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Proteinanteile im Plastochinon-Bereich zu identifizieren. Auf Seiten der Plastochinon-Reduktion ist durch viele Untersuchungen die Existenz eines Proteins nachgewiesen, das als "Schild" (Renger, 1976) die in die Membran eingebetteten Plastochinone überdeckt. Das Protein hat mehrere Eigenschaften, die es besonders interessant macht. Es bindet Herbizide, die den Elektronenfluß zwischen Q und B unterbrechen, aber auch Bikarbonat bzw. CO_2, ohne das kein Elektronenübergang zwischen Q und dem Plastochinon-pool möglich ist (Govindjee und van Rensen, 1978; Sarojini und Govindjee, 1980).

Auf Grund der hohen Spezifität von bestimmten Hemmstoffen für dieses Protein bietet es sich an, sie als Mittel zur Markierung einzusetzen. Bisher entzog sich der Rezeptor einer genaueren Identifizierung, da die bekannten Inhibitoren reversibel an ihren Wirkort binden. Nur die kovalente Bindung eines radioaktiv markierten Hemmstoffes erlaubt es, nach dem notwendigen Prozeß der Membransolubilisierung und Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese den markierten Proteinteil wiederzufinden.

Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) ist ein Hemmstoff des entkoppelten photosynthetischen Elektronentransportes, für den nachgewiesen wird, daß er die Reduktion und in höheren Konzentrationen auch die Oxidation des Plastochinon-pools blockiert. Carbodiimide sind sehr reaktive Substanzen, die leicht kovalente Bindungen eingehen. Die seit langem bekannte Eigenschaft des lipophilen DCCD's als Hemmstoff von Protonentranslokationen und dessen kovalente Wechsel-

wirkung mit Protonenkanälen wie zum Beispiel dem CF_o-Teil der ATP-Synthetase in Chloroplasten ließ vermuten, daß die Hemmung des ebenfalls protonenabhängigen Plastochinon-shuttles auf einer Interaktion des Carbodiimids mit protonentransportierenden Proteinen in diesem Membranbereich zurückzuführen ist. Tatsächlich wird unter entsprechenden Bedingungen eine Reihe von Membranproteinen mit ^{14}C-DCCD radioaktiv markiert (Abb.8). Zwei Peptide mit einem Molekulargewicht von 19 und 20kD treten besonders hervor, denen eine entsprechende Rolle zugeordnet werden könnte. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich aber heraus, daß die Hemmwirkung von DCCD reversibel ist und daher eine kovalente Bindung an die Membran als Grund für die Hemmwirkung wahrscheinlich nicht in Frage kommt. Eine Gruppe russischer Wissenschaftler (Pototsky et al, 1981) fand kürzlich, daß DCCD in Rhodospirillum rubrum Chromatophoren den Elektronenfluß zwischen dem primären, fest gebundenen und dem sekundären Ubichinon blockiert. Ob ein ähnlicher Effekt zwischen den verschiedenen Plastochinon-Spezies in der Thylakoidmembran Grund für die Hemmung ist, bleibt zu untersuchen.

Mehr Informationen über das B-Protein versprach der vom bekannten Phenolherbizid Dinoseb abgeleitete Inhibitor 4-Nitro-2-azido-6-(2',3'-^3H)isobutylphenol (^3H-DNSA). Als Arylazid bildet diese Verbindung im Licht Nitrene, die sofort kovalent an ihre nächste Umgebung binden. Wie alle Hemmstoffe zeigt DNSA in Bindungsexperimenten einen spezifischen und unspezifischen Bindungsanteil. In einer Konzentration von $1{,}9 \times 10^{-7}$M hat er 50% seiner Bindungsstellen besetzt. Ungefähr ein Molekül Azid pro 280 Moleküle Chlorophyll bindet an die Membran, was wiederum etwa einem Molekül Azid pro Elektronentransportkette entspricht (Oettmeier et al, 1980). Die Markierung der Thylakoidmembran mit ^3H-DNSA führt auf Polyacrylamid-

Gelen zu zwei radioaktiven Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 16 und 40kD, die beide durch Vorinkubation mit i-Dinoseb oder DCMU nicht in Erscheinung treten. Diese Versuche zur Verdrängung des radioaktiv markierten Hemmstoffes durch analog wirkende Inhibitoren machen deutlich, wie spezifisch die Radioaktivität in nur zwei Banden abnimmt, die Lipid enthaltenden und ebenfalls markierten Gelbereiche ($Chl_{a/b}$-P2 und freie Pigmente) aber unbeeinflußt bleiben (Abb. 14 und Abb.15).

Mit DCMU -Typ-Herbiziden finden andere Autoren als Rezeptor ein 32kD Polypeptid (Croze et al, 1979; Leto und Miles, 1980; Pfister et al, 1981; Gardner, 1981; Mattoo et al, 1981). Phenole und DCMU-Hemmstoffe haben die gleiche Auswirkung auf den Elektronentransport, indem sie den Elektronenfluß zwischen Q und dem Plastochinonpool unterbrechen. Beide Hemmstoffgruppen verdrängen sich aber nichtkompetitiv, und Trypsin-Behandlung, die zum Verlust der spezifischen Bindung von DCMU-Herbiziden führt, ändert weder die Bindungskonstante von Phenolen noch beeinflußt sie wesentlich die Anzahl der Phenol-Bindungsstellen (Oettmeier und Masson, 1980). Im Gegensatz zu Inhibitoren des DCMU-Typs hemmen Phenole den photosynthetischen Elektronentransport verzögert, d.h. sie müssen wahrscheinlich eine Barriere überwinden, ehe sie den Wirkort erreichen (Reimer et al, 1979; Böger und Kunert, 1979).

Weitere Unterschiede werden bei Experimenten mit Digitonin-PS II-Partikeln deutlich. Partikel mit hohem Anteil an Fremdprotein sind gegenüber DCMU und Phenolen ähnlich empfindlich wie intakte Thylakoide (Abb.20). Relativ saubere PS II-Präparationen zeigen eine stark verringerte DCMU-Empfindlichkeit, während die Phenole den Elektronentransport nahezu unverändert gut hemmen (Abb.17; Tabelle 2).

Trypsin-Behandlung von PS II-Partikeln (mit hohem Fremdproteinanteil) führt zur fast vollständigen Aufhebung der DCMU-Empfindlichkeit. Die Hemmung durch Phenole wird in den ersten Minuten der Trypsin-Einwirkung zunächst verbessert, aber schließlich auch teilweise aufgehoben (Abb.19). Die Aufhebung der Phenolempfindlichkeit erfolgt später als die der DCMU-Empfindlichkeit. Kurzzeitige Trypsin-Inkubation erhöht die Rate der DCIP-Reduktion. Die Steigerung dieser Rate fällt interessanterweise zusammen mit der erhöhten Phenolempfindlichkeit (Abb.19) und weist auf eine verbesserte Zugänglichkeit des Akzeptors zu seinem Reduktionsort hin.

Ein Konzept, das das B-Protein in zwei Untereinheiten mit je einer Bindungsstelle für Phenole und DCMU-Herbizide unterteilt, kann eine Reihe von Befunden erklären. In Erweiterung und Spezifizierung der Modelle von Renger (1976) bzw. Trebst und Draber (1979) führen die hier vorgestellten Ergebnisse zu folgendem, stark schematisierten Bild von der Herbizidbindungsstelle auf der Matrixseite der Thylakoidmembran (Abbildung 22): das 32kD Polypeptid als Wirkort für

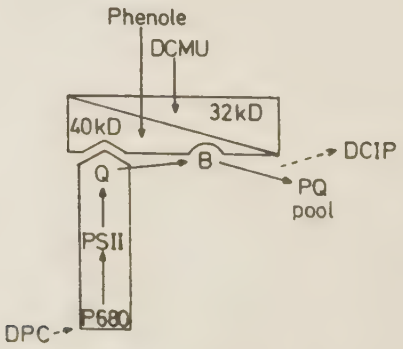


Abb.22: Schema eines in zwei Untereinheiten geteilten Herbizidbindungsproteins (B-Protein) auf der Matrixseite der Thylakoidmembran

DCMU-Typ-Herbizide überdeckt das 40kD Protein, das Bindestelle für die Phenole ist. Das exponierte 32kD Protein wird durch das wasserlösliche, membranimpermeable Trypsin-Molekül zuerst angegriffen. Dabei geht die DCMU-Bindungsstelle verloren. Die Barriere, die den verzögerten Wirkungseintritt der Phenole verursacht, wird ebenfalls entfernt. Das tiefer in die Membran eingebettete 40kD Protein kann nun vom Trypsin erreicht werden und verändert die Phenol-Bindestelle. Der Primärakzeptor Q wird zugänglich für wasserlösliche Ein-Elektronen-Akzeptoren wie Fecy, die nun in einer Hemmstoff-unempfindlichen Reaktion reduziert werden können (Regitz und Ohad, 1976; Renger, 1976). Hoch gereinigte Photosystem II-Partikel mit stark verminderter DCMU-Sensitivität, aber unveränderter Phenolempfindlichkeit haben die Bindungsstelle für DCMU-Typ-Herbizide verloren.

Das Herbizidbindungsprotein auf der reduzierenden Seite von Photosystem II gewinnt zunehmend Interesse nicht zuletzt durch die Versuche von Edelman et al (1980) und Mattoo et al (1981) mit Spirodela, in der ein Trypsin-labiles 32kD Protein in größeren Mengen synthetisiert, aber gleichzeitig sehr schnell wieder metabolisiert wird. Synthese und Abbau des Proteins werden durch Licht kontrolliert. Diese Befunde, dazu die Lokalisierung des Proteins auf der Matrixseite vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (PQ-shuttle), und die Möglichkeit, den Elektronentransfer zwischen Q und dem PQ-pool sowohl durch artifizielle Substanzen (Herbizide) als auch durch das physiologische CO_2 allosterisch zu beeinflussen, weisen darauf hin, daß das Protein als Q-PQ-Oxidoreduktase eine regulatorische Funktion im photosynthetischen Elektronentransport ausübt. Beweise für diese Hypothese stehen noch aus.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Thylakoidmembran der Chloroplasten enthält die Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportes und der Photophosphorylierung. Nach SDS-Solubilisierung können mit einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) mehr als 30 Proteine aus der Membran aufgetrennt werden. Ihre Zuordnung zu den funktionellen Redoxcarriern ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Untersuchungen der Plastochinon-Funktion haben aber kürzlich Hinweise für spezielle Proteine ergeben, die Bindestellen für spezifische Inhibitoren besitzen. Radioaktiv markierte Hemmstoffe bieten die Möglichkeit, diese Proteine zu erkennen. Voraussetzung für die Erkennung der markierten Peptidbanden auf den PAGE-Gelen ist eine kovalente Bindung der Hemmstoffe an den Wirkort. Die Hemmstoffe müssen zu diesem Zweck noch eine weitere reaktive Gruppierung besitzen.

Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) ist eine Verbindung, die kovalent an Proteine binden kann. Es wird gezeigt, daß DCCD ein Hemmstoff der Plastochinon-Reduktion ist. Höhere Konzentrationen beeinträchtigen auch die Oxidation des Chinons. ^{14}C-DCCD in Konzentrationen, die den Elektronentransport zu 50-70% hemmen, markiert eine Vielzahl von Thylakoidproteinen. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Auftreten markierter Proteine und der Hemmung des Elektronentransportes war daher nicht festzustellen. Es wurde deshalb versucht, sie über DCCD-insensitive Chloroplasten aus Gerstenmutanten zu identifizieren. Dabei zeigte sich jedoch, daß das hohe Protein/Chlorophyll-Verhältnis der Mutanten, verglichen mit dem Wildtyp, für einen Teil der DCCD-Unempfindlichkeit verantwortlich ist. Dies gab Anlaß, den Einfluß von Fremdprotein auf die DCCD-Hemmung des Elektronentransportes zu untersuchen. Die Aufhebung der Hemmung

durch Serumalbumin zeigte, daß die Inhibierung des Elektronenflusses durch DCCD nicht auf einer kovalenten Bindung des Hemmstoffes beruht. Mithin kann durch DCCD trotz seiner Reaktivität das Plastochinon-Bindeprotein nicht unter den vielen Membranpeptiden identifiziert werden. Die Versuche ergaben aber Hinweise auf die Beteiligung von lokalen Protonengradienten bzw. protonisierbaren Gruppierungen bei der Protonenaufnahme und -abgabe im Plastochinon-Redoxzyklus.

Herbizide wie DCMU und substituierte Phenole spielen eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung des Photosynthesemechanismus, da sie spezifisch die Plastochinon-Reduktion durch Photosystem II hemmen. Sie binden reversibel an ein der Matrixseite der Thylakoidmembran zugewandtes Protein. Das Arylazid 4-Nitro-2-azido-6-(2',3'-^{3}H)isobutylphenol (^{3}H-DNSA) besitzt die Eigenschaft, bei Belichtung kovalent mit der nächsten Umgebung zu reagieren. Mit diesem spezifisch wirkenden Inhibitor der Plastochinon-Reduktion sollte es gelingen, die Proteinkomponente der Hemmstoffbindestelle und damit der Plastochinon-Funktion zu identifizieren.

Die Versuche brachten ein eindeutiges Ergebnis. Von den durch das Photolabel markierten und dann in der PAGE aufgetrennten Membranpeptiden wird nur von zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 16 und 40kD die Markierung durch Vorinkubation mit Hemmstoffanaloga des DCMU- und Phenol-Typs wieder verdrängt. Diese beiden Peptide tragen demnach die Bindestellen für die Herbizide und sind damit Teil (Untereinheiten) des B-Protein genannten Membranenzyms, das für die Plastochinon-Reduktion verantwortlich ist.

Zur näheren Charakterisierung der Bindungsstelle wurden Photosystem II-Partikel präpariert, deren photosynthetische Aktivität eine

stark verminderte Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen des DCMU-Typs aufweisen. Phenolische Inhibitoren sind jedoch in ähnlichen Konzentrationen wirksam wie in unfragmentierten Thylakoiden. Photosystem II-Partikel mit hohem Fremdproteinanteil besitzen die reduzierte DCMU-Sensitivität nicht. Trypsin-Behandlung dieser Partikel führt zur Unempfindlichkeit gegenüber DCMU, während das Phenolherbizid i-Dinoseb in der Anfangsphase der Proteolyse die Photosystem II-abhängige DCIP-Reduktion besser hemmt. Erst nach längerer Enzym-Einwirkung wird auch die Phenol-Hemmung zum Teil aufgehoben, diese Aufhebung setzt aber zu einem späteren Zeitpunkt ein als die der DCMU-Hemmung.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß die Bindung von Herbiziden des DCMU- und des Phenol-Typs trotz der Gleichartigkeit ihrer Wirkung auf den photosynthetischen Elektronentransport nicht an völlig identischen Rezeptorstellen, nicht einmal an gleichen Peptiduntereinheiten erfolgt. Dies wird direkt bestätigt durch Arbeiten anderer Autoren, wonach ein Photolabel des DCMU-Typs (Azido-Atrazin) ein 32kD Protein markiert. Unserem derzeitigen Kenntnisstand über den Proteinteil der Plastochinon-Reduktionsstelle wird ein Modell gerecht, in dem eine 32kD Untereinheit mit der DCMU-Bindestelle einer 40kD Untereinheit mit der Phenol-Bindestelle aufliegt. Die 32kD Untereinheit trägt die B genannte Plastochinon-Bindestelle, während die 40kD Untereinheit die Bindestelle für das spezifische Plastochinon des Primärakzeptors Q trägt oder umschließt.

MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Die Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

4-Nitro-2-azido-6-(2',3'-^{3}H)isobutylphenol (^{3}H-DNSA) mit einer spezifischen Aktivität von 350 mCi/mMol wurde von Dr. W.Oettmeier synthetisiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Bereitstellung von ^{14}C-Dicyclohexylcarbodiimid (^{14}C-DCCD) mit einer spezifischen Aktivität von 28,2 mCi/mMol danke ich Prof. Dr. Altendorf recht herzlich.

Acrylamid und Bisacrylamid stammen von Sigma (München), DCCD von Serva (Heidelberg), Digitonin von Merck (Darmstadt) bzw. Serva, SDS von Pierce, Trypsin aus Rinderpankreas und Trypsin-Inhibitor aus Hühnereiweiß von Boehringer (Mannheim).

2.Chloroplastenpräparation

Chloroplasten aus Spinatblättern wurden in Anlehnung an die Methode von Nelson et al (1970) als "broken chloroplasts" isoliert. Dazu wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung I (STN): 0,4M Saccharose
10mM Tricin-NaOH pH8,0
10mM NaCl
5mM $MgCl_2$

Lösung II: 5mM Tricin-NaOH pH8,5

Etwa 50g kalte, mit destilliertem Wasser gewaschene Spinatblätter werden in Lösung I im Omnimixer 10-15 s bei höchster Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenat wird durch zweifache Nylongaze gepreßt und das Filtrat 5min bei 3000g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in Lösung II suspendiert (osmotischer Schock) und dann bei 21000g 1min lang zentrifugiert. Dieser Schritt wird mit dem so erhaltenen Sediment noch ein- bis zweimal wiederholt.

Zur Bestimmung der photosynthetischen Aktivität werden die Chloroplasten schließlich in Lösung I aufgenommen und im Eis aufbewahrt.

Chloroplasten aus Wildtyp-Gerste und Gerstenmutanten wurden nach der Vorschrift von Machold et al (1979) isoliert. Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr.D.von Wettstein, G. Høyer-Hansen und Dr.B. Lindberg Møller für die Möglichkeit bedanken, im Carlsberg Labor (Kopenhagen) die Mutanten heranziehen und testen zu können. G. Høyer-Hansen hat mich mit viel Geduld außerdem in die Technik der Gel-Elektrophorese eingewiesen.

3. Bestimmung des Chlorophyll-Gehaltes

Die Bestimmung des Chlorophyll-Gehaltes erfolgte nach der Methode von Arnon (1949). Das Chlorophyll a/b-Verhältnis wurde nach der Formel von Bruinsma (1963) bestimmt.

4. Bestimmung der photosynthetischen Aktivitäten

a) Methylviologen-Reduktion und Fecy-Reduktion

Sauerstoff-Aufnahme (Mv-Reduktion) oder O_2-Entwicklung (Fecy-Reduktion) wurden im Elektrodengefäß einer Clark-Elektrode (Delieu und Walker, 1972) verfolgt. Das jeweils unter den Abbildungen angegebene Reaktionsgemisch wurde auf 20°C temperiert und mit Rotlicht (Filter KG 2 und RG 645, Jenaer Glaswerk Schott und Gen., Mainz) einer Intensität von 10^5 ergs/cm^2/s bestrahlt. Die Eichung der Elektrode erfolgte mit luftgesättigtem Wasser (0,276 µMole O_2/ml H_2O bei 20°C) und Dithionit-Zugabe.

b) DCIP-Reduktion

Die Elektronentransportrate mit Dichlorphenol-Indophenol (DCIP) als Akzeptor wurde durch die zeitliche Änderung der Extinktion bei 600nm im Zeiss PM Q II-Spektralphotometer mit seitlicher Belichtung (10^6 ergs/cm^2/s) bestimmt. Die Zusammensetzung des Reaktionsmediums ist unter den Abbildungen beschrieben.

5. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Chua (1980) durchgeführt. Bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Gelen handelt es sich ausschließlich um 11-15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele, deren Herstellung im folgenden beschrieben wird.

a) Präparation des 11-15%igen Trenngels und des Sammelgels

Stammlösungen:

Lösung 1: 30% (w/v) Acrylamid - 0,8% (w/v) Bisacrylamid
" 2: 10% (w/v) Na-Dodecylsulfat (SDS)
" 3: 10% (w/v) Ammoniumpersulfat

Lösung 4: 60% (w/v) Saccharose
" 5: 20x oberer Elektrodenpuffer (0,04M Tris-0,04M Borat, pH 8,6)
" 6: 4x Sammelgel-Puffer (0,054M Tris-0,027M H_2SO_4 , pH 6,1)
" 7: 5x unterer Elektrodenpuffer (0,424M Tris-0,031M HCl, pH 9,2)
" 8: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Folgende Lösungen wurden aus den Stammlösungen hergestellt:

Trenngel:

Stammlösung	15% Acrylamid	11% Acrylamid
1	45 ml	33 ml
7	18 ml	18 ml
4	25,8 ml	7,6 ml
2	0,9 ml	0,9 ml
H_2O	-	30,2 ml
8	0,02ml	0,04ml
3	0,3 ml	0,3 ml

Sammelgel:

Stammlösung	
1	8 ml
6	10 ml
2	0,4 ml
H_2O	21,2 ml
8	0,04ml
3	0,4 ml

Die Lösungen reichen zur Herstellung von zwei 1mm dicken Flachgelen der Größe 24 x 30 cm. Der Gradient wird mit Hilfe eines Gradientenmischers erzeugt, indem 35 ml des 15%igen und 38 ml des 11%igen Acrylamids in die Kammern des Mischers gegeben werden. Innerhalb von 25 min müssen die Lösungen herausgelaufen sein (Ge-

fahr der Polymerisation noch im Gradientenmischer). Um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erreichen, wird etwas Isobutanol darübergegeben . Nach der Polymerisation (ca.60min) wird das Lösungsmittel abgeschüttet und die Geloberfläche mit Wasser gespült, bevor das Sammelgel eingefüllt wird. Die fertigen Gele müssen mindestens einen Tag bei 4°C in feuchter Luft gelagert werden.

b) Probenvorbereitung

0,3 ml Chloroplastensuspension mit einer Chl-Konzentration von 1,7 mg/ml in 0,1M Na_2CO_3 (oder 0,1M Tricin-NaOH pH 8,0) werden mit 0,2 ml 5% (w/v) SDS/30% (w/v) Saccharose versetzt, 5% Mercaptoäthanol hinzugefügt und kräftig geschüttelt.

c) Eichproteine

Als Referenzproteine für die Molekulargewichtsbestimmung dienten: Albumin aus Rinderserum, 68kD; Albumin aus Hühnerei, 45kD; Chymotrypsinogen A, 25kD; Cytochrom c, 12,5kD. Die Proteine waren Bestandteil eines Eichsets von Boehringer (Mannheim). Sie wurden,wie unter der Probenvorbereitung beschrieben, behandelt und noch zusätzlich 2 min im Wasserbad gekocht.

d) Elektrophorese

In die obere Kammer der Elektrophoreseapparatur wird der 1:20 verdünnte obere Elektrodenpuffer (Lösung 5), in die untere Kammer der 1:5 verdünnte untere Elektrodenpuffer (Lösung 7) eingefüllt. Bis zu 40 µl Probe/Tasche (entspricht 40 µg Chl oder etwa 200 µg Protein) kann aufgegeben werden. Bei konstant gehaltenem Strom (14 mA) ist die Elektrophorese nach 14-16 Stunden beendet.

e) Fixierung, Färbung und Trocknung des Gels·

Nach 30 min Fixierung in Methanol/Eisessig/H_2O (50/7/43) wird das Gel in der Fixierungslösung, die zusätzlich 0,25% Serva Blau G (äquivalent zu Coomassie Brilliant Blue G-250) enthält, ein bis zwei Stunden bei ständiger Bewegung gefärbt. Anschließend wird mit der Fixierungslösung wieder entfärbt, bis der Hintergrund klar ist.

Das Polypeptidmuster wird photographiert oder mit einem Isco-Gel-scanner bei 620nm abgefahren. Bei Bedarf (z.B. für Autoradiogramme) kann das Gel auch getrocknet werden, indem man es auf Chromatographiepapier überträgt und über Nacht im Vakuum das Wasser entzieht.

Für die Photographien der Gele möchte ich mich bei Herrn H.Winking herzlich bedanken.

f) Bestimmung der Radioaktivität im Gel

1) Autoradiographie (Fluorographie)

Das gefärbte Gel wird für eine Stunde in EN^{3}HANCE (New England Nuclear) gelegt und anschließend eine weitere Stunde gewässert. Dann wird es getrocknet, auf einen Röntgenfilm des Typs Kodak X-OMAT R gelegt und bei -80°C aufbewahrt. Je nach verwendetem Isotop muß eine bis mehrere Wochen gewartet werden, ehe der Film entwickelt werden kann.

2) Scintillationszähler

Das Gel, von dem ein Densitogramm oder eine Photographie angefertigt wurde, wird mit einem Gel-slicer (Bio-Rad Modell 195) in

1 mm Stücke zerschnitten. Jeweils zwei Stücke/Glas werden über Nacht in 17% H_2O_2 (1ml) bei 55°C aufgelöst und mit 10ml Quickszint 212 (Zinsser, Frankfurt) versetzt. Die Radioaktivität wird in einem Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer (Modell 3385) bestimmt.

Bemerkung: Die verwendete Schneidapparatur sägt das Gel in Stücke. Trifft eine der Sägen direkt in eine radioaktiv markierte Bande, geht ein Teil der Strahlung mit den "Sägespänen" verloren.

6. Präparation von Digitonin-Photosystem II-Partikeln

Die Präparation folgt im wesentlichen der von Satoh (1979) beschriebenen Methode.

Etwa 3 kg Spinat werden nach dem unter Punkt 1 (Chloroplastenpräparation) beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Die Thylakoidmembranen im letzten Sediment werden mit wenig 50mM Tricin-NaOH pH 8,0/ 5mM $MgCl_2$ auf eine Chl-Konzentration von 3,5-4 mg/ml gebracht; eine 10%ige Digitonin-Lösung (erwärmt) unter Rühren der Chloroplasten im Eisbad zutropfen lassen, bis die Suspension 1,25 Prozent Digitonin enthält (3-4 g Digitonin/g Chl); eine Stunde bei 0°C rühren lassen, dann 2 min bei 1000g zentrifugieren und das Sediment verwerfen; den Überstand bei 30000g 60min lang zentrifugieren und das so erhaltene Sediment in wenig 50mM Tricin-NaOH pH 8,0/5mM $MgCl_2$/0,35M NaCl lösen und auf 1,25% Digitonin (siehe oben) bringen (ca. 4 g Digitonin/g Chl); 18-20 Stunden bei 0°C rühren lassen.

Nach dieser Zeit die Suspension 60 min bei 100 000g zentrifugieren und das Sediment verwerfen; den überstand auf 6 Zentrifugenbecher (für einen SW 27-Rotor) mit 10-30%igen Saccharose-Gradienten (50 mM Tricin-NaOH pH 8,0/5mM $MgCl_2$/0,4% (w/v) Digitonin/ 10-30% (w/v) Saccharose) verteilen; 40-48 Stunden bei 100 000g und 0°C zentrifugieren.

Die grünen und rotbraunen Banden werden vorsichtig mit einer Spritze abgesaugt und die photosynthetische Aktivität mit DPC als Elektronendonor und DCIP als Akzeptor gemessen.

Bemerkung: Wie im Ergebnisteil beschrieben ergibt die Verwendung von Digitonin der Firma Merck im Gegensatz zu dem der Firma Serva zwar geringere Ausbeuten an Photosystem II-Partikeln, aber dafür einen höheren Reinheitsgrad. Beide Chargen unterscheiden sich in ihrer Wasserlöslichkeit.

7. Radioaktive Markierung der Thylakoidproteine mit dem Photolabel 4-Nitro-2-azido-6-(2',3'-^{3}H)isobutylphenol (^{3}H-DNSA)

Eine Chloroplastensuspension (2 ml) in 20mM Tricin-NaOH pH 8,0/ 20mM $MgCl_2$ mit einem Chl-Gehalt von 1 mg/ml wird mit einer unter den Abbildungen angegebenen Menge ^{3}H-DNSA (in Methanol) versetzt. Die Probe wird mit Argon begast und unter ständigem Rühren im Eisbad 15 min mit einer sehr starken Lichtquelle (2000 Watt, Weißlicht) bestrahlt. Nach dreimaligem Waschen werden die Chloroplast wie unter Punkt 5b (Probenvorbereitung) behandelt.

LITERATURVERZEICHNIS

Allen, C.F., Good, P., Trosper, T., Park, R.B.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 48, 907-913 (1972)

Anderson, J.M., Boardman, N.K.
Biochim.Biophys.Acta 112, 403-421 (1966)

Anderson, J.M., Waldron, J.C., Thorne, S.W.
FEBS Lett. 92, 227-233 (1978)

Arnon, D.J.
Plant Physiol. 24, 1-15 (1949)

Ausländer, W., Junge, W.
Biochim.Biophys.Acta 357, 285-298 (1974)

Avron, M., Chance, B.
Brookhaven Symp.Biol. 19, 149-160 (1966)

Bengis, C., Nelson, N.
J.Biol.Chem. 252, 4564-4569 (1977)

Böger, P., Kunert, K.-J.
Z.Naturforsch. 34c, 1015-1025 (1979)

Böhme, H., Cramer, W.
Biochemistry N.Y. 11, 1155-1160 (1972)

Bouges-Bocquet, B.
Biochim.Biophys.Acta 314, 250-256 (1973)

Bruinsma, J.
Photochem.Photobiol. 2, 241-249 (1963)

Carlsen, B.
Carlsberg Res.Commun. 42, 199-209 (1977)

Casey, R.P., Thelen, M., Azzi, A.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 87, 1044-1051 (1979)

Chua, N.-H.
in: Methods of Enzymology, Vol. 69 C, San Pietro ed.
Academic Press (1980)

Croze, E., Kelly, M., Horton, P.
FEBS Lett. 103, 22-26 (1979)

Debuch, H.
Experientia 18, 61-65 (1962)

Delepelaire, P., Chua, N.-H.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 76, 111-115 (1979)

Delieu, T., Walker, D.A.
New Phytol. 71, 201-225 (1972)

Dunker, A.K., Rueckert, R.R.
J.Biol.Chem. 244, 5074-5080 (1969)

Duysens, L.N.M., Sweers, H.E.
in: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria
Tokyo: Univ.Tokyo, 353-372 (1963)

Eaglesham, A.R.J., Ellis, R.J.
Biochim.Biophys.Acta 335, 396-407 (1974)

Edelman, M., Mattoo, A.K., Hoffman-Falk, H.
Proceedings 5th Intern. Congess Photosynth. Greece,
im Druck (1980)

Gardner, G.
Science 211, 937-940 (1981)

Gorkom, H.J. van

Biochim.Biophys.Acta 347, 439-442 (1974)

Govindjee, van Rensen, J.J.S.

Biochim.Biophys.Acta 505, 183-213 (1978)

Hauska, G., Trebst, A.

in: Current Topics in Bioenergetics, Vol.6, D.Rao Sanadi ed.
Academic Press (1977)

Henriques, F., Park, R.B.

Plant Physiol. 62, 856-860 (1978)

Hill, R., Bendall, F.

Nature 186, 136-137 (1960)

Hiller, R.G., Pilger, B.G., Campbell, D.

Plant Sci.Lett. 14, 7-11 (1979)

Høyer-Hansen, G., Møller, B.L., Pan, L.

Carlsberg Res.Commun. 44, 337-351 (1979)

Hurt, E., Hauska, G.

Proceedings 5th Intern. Congress Photosynth. Greece,
im Druck (1980)

Huzisige, H., Usiyama, H., Kikuti, T., Asi, T.

Plant Cell Physiol. 10, 441-455 (1969)

Izawa, S., Pan, R.L.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 83, 1171-1177 (1978)

Jakobi, G., Lehmann, H.

Z.Pflanzenphysiol. 59, 457-461 (1968)

Junge, W.

Ber. Deutsche Bot. Ges. 88, 283 (1975)

Knaff, D.B., Malkin, R., Myron, J.C., Stoller, M.
Biochim.Biophys.Acta 459, 402-411 (1977)

Leto, K.J., Miles, D.
Plant Physiol. 66, 18-24 (1980)

Lichtenthaler, H.K., Park, R.B.
Nature 198, 1070-1072 (1963)

Machold, O., Meister, A.
Biochim.Biophys.Acta 546, 472-480 (1979)

Machold, O., Simpson, D.J., Møller, B.L.
Carlsberg Res.Commun. 44, 235-254 (1979)

Margolis, J., Kendrick, K.G.
Analyt. Biochem. 25, 347-362 (1968)

Markwell, J.P., Thornber, J.P., Boggs, R.T.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 76, 1233-1235 (1979)

Mattoo, A.K., Pick, U., Hoffmann-Falk, H.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 78, 1572-1576 (1981)

McCarty, R.E., Racker, E.
J.Biol.Chem. 242, 3435-3439 (1967)

McCarty, R.E.
in: Methods in Enzymology, Vol. 23, San Pietro ed.
Academic Press (1971)

McCarty, R.E.
in: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 5,
Springer Verl., 437-447 (1977)

Mitchell, P.
Nature 191, 144-148 (1961)

Mitchell, P.

in: Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation, E. Quagliarello et al eds., Am. Elsevier, North Holland (1975)

Møller, B.L., Høyer-Hansen, G.

Proceedings 5th Intern. Congress Photosynth. Greece, im Druck (1980)

Mullet, J.E., Burke, J.J., Arntzen, C.J.

Plant Physiol. 65, 814-823 (1980)

Mullet, J.E., Arntzen, C.J.

Biochim.Biophys.Acta 635, 236-248 (1981)

Nelson, N., Drechsler, Z., Neumann, J.

J.Biol.Chem. 245, 143-151 (1970)

Nelson, N.

Biochim.Biophys.Acta 456, 314-338 (1976)

Nelson, N., Eytan, E., Bat-El Notsani, Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K., Gitler, C.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 2375-2378 (1977)

Neville, D.M., Jr.

J.Biol.Chem. 246, 6328-6334 (1971)

Oettmeier, W., Masson, K.

Pesticide Biochemistry and Physiology 14, 86-97 (1980)

Oettmeier, W., Masson, K., Johanningmeier, U.

FEBS Lett. 118, 267-270 (1980)

Oettmeier, W., Johanningmeier, U., Trebst, A.

in: Function of Quinones in Energy Conserving Systems, im Druck

Pfister, K., Arntzen, C.J.
Z.Naturforsch. 34c, 996-1009 (1979)

Pfister, K., Radosevich, S.R., Arntzen, C.J.
Plant Physiol. 64, 995-999 (1979)

Pfister, K., Steinback, K.E., Gardner, G., Arntzen, C.J.
Proc.Natl.Acad.Sci. 78, 981-985 (1981)

Pototsky, N.Y., Remennikov, V.G., Kotova, E.A., Samuilov, V.D.
Biochim.Biophys.Acta 634, 266-270 (1981)

Poulsen, C.S., Strøbaeck, S., Haslett, B.G.
in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondri
Th.Bücher et al eds., Elsevier/North-Holland Biomedical Pres
Amsterdam, 17-24 (1976)

Pulles, M.P.J., van Gorkom, H.J., Willemsen, J.G.
Biochim.Biophys.Acta 449, 536-540 (1976)

Regitz, G., Onad, J.
J.Biol.Chem. 251, 247-252 (1976)

Reimer, S., Link, K., Trebst, A.
Z.Naturforsch. 34c, 419-426 (1979)

Reinwald, E., Stiehl, H.H., Rumberg, B.
Z.Naturforsch. 23b, 1616-1617 (1968)

Reiser, A., Willets, F.W., Terry, G.C., Williams, V., Marley, R.
Trans. Faraday Soc. 64, 3265-3275 (1968)

Remy, R., Hoarau, J.
in: Chloroplast Development, G.Akoyounoglou et al eds.,
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 235-240 (1978)

Renger, G.

Biochim.Biophys.Acta 440, 287-300 (1976)

Renger, G.

in: Bioenergetics of Membranes, L.Packer et al eds.,
Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)

Sane, P.V., Goodchild, D.J., Park, R.B.

Biochim.Biophys.Acta 216, 162-178 (1970)

Sane, P.V., Johanningmeier, U., Trebst, A.

FEBS Lett. 108, 136-140 (1979)

Sarojini, G., Govindjee

Proceedings 5th Intern. Congress on Photosynth. Greece,
im Druck (1980)

Satoh, K.

Biochim.Biophys.Acta 546, 84-92 (1979)

Schliephake, W., Junge, W., Witt, H.T.

Z.Naturforsch. 23b, 1561-1578 (1968)

Selman, B.R., Bannister, T.T.

Biochim.Biophys.Acta 253, 428-436 (1971)

Siggel, U.

Proceedings 3th Intern. Congress on Photosynth., Avron ed.,
Elsevier, Amsterdam, 645-654 (1975)

Siggel, U.

J.Bioelectrochem.Bioenerg. 3, 302-318 (1976)

Spector, M., Winget, G.D.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 957-959 (1980)

Staros, J.V.

TIBS 5, 320-322 (1980)

Steinback, K.E., Pfister, K., Arntzen, C.J.

Z.Naturforsch. 36c, 98-108 (1981)

Stiehl, H.H., Witt, H.T.

Z.Naturforsch. 24b, 1588-1598 (1969)

Thornber, J.P., Gregory, R.P.F., Smith, C.A., Bailey, J.L.

Biochemistry 6, 391-396 (1967)

Thornber, J.P., Markwell, J.P., Reinmann, S.

Photochem.Photobiol. 29, 1205-1216 (1979)

Tischer, W., Strotmann, H.

Biochim.Biophys.Acta 460, 113-125 (1977)

Trebst, A., Reimer, S.

Biochim.Biophys.Acta 305, 129-139 (1973)

Trebst, A., Reimer, S.

Z.Naturforsch. 28c, 710-716 (1973a)

Trebst, A., Reimer, S., Dallacker, F.

Plant Science Letters 6, 21-24 (1976)

Trebst, A.

Z.Naturforsch. 34c, 986-991 (1979)

Trebst, A., Draber, W.

in: Advances in Pesticide Science, Part 2, H.Geissbühler ed.

Pergamon Press Oxford New York, 223-234 (1979)

Trebst, A.

in: Methods in Enzymology, Vol. 69, San Pietro ed.,

Academic Press (1980)

Trebst, A.

in: Cell Compartimentation and Metabolic Channeling, L.Nover et al eds., VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (DDR) und Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1980a)

Uribe, E.G.

Biochemistry 11, 4228-4235 (1972)

Velthuys, B.R., Amesz, J.

Biochim.Biophys.Acta 333, 85-94 (1974)

Vernon, L.P., Shaw, E.R., Ogawa, T., Raveed, D.

Photochem.Photobiol. 14, 343-357 (1971)

Weber, K., Osborn, M.

J.Biol.Chem. 244, 4406-4412 (1969)

Wessels, J.S.C., van Alphen-van Waveren, O., Voorn, G.

Biochim.Biophys.Acta 292, 741-752 (1973)

Wettstein, D.von, Møller, B.L., Høyer-Hansen, G., Simpson, D.J.

EC Solar Energy R&D Programme, 3rd Coordination Meeting of Contractors, 18-20. Juni, Brüssel (1979)

White, C.C., Chain, R.K., Malkin, R.

Biochim.Biophys.Acta 502, 127-137 (1978)

Witt, H.T.

Q.Rev.Biophys. 4, 365-477 (1971)

Witt, H.T.

in: Bioenergetics of Photosynthesis, Govindjee ed., Academic Press, 493-554 (1975)

Wolf, F.T., Coniglio, J.G., Davis, J.T.

Plant Physiol. 37, 83-85 (1962)

Herrn Prof. Dr. A. Trebst danke ich sehr herzlich für seine stete Bereitschaft zur Diskussion und für jede erdenkliche Förderung.

An dieser Stelle sei auch Prof. Dr. P.V. Sane, Prof. Dr. D. von Wettstein und Dr. W. Oettmeier sowie den Mitarbeitern des Lehrstuhls für ihre wertvolle Unterstützung gedankt.

LEBENSLAUF

Am 17. Februar 1952 wurde ich als Sohn des Bergingenieurs Helmut Johanningmeier und seiner Ehefrau Inge, geb. Dölle, in Gladbeck geboren.

Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Wilhelmschule in Gladbeck, von 1962 bis 1970 das Städtische Mathemat.-Naturwissenschaftl. Gymnasium Gladbeck. Dort legte ich im Juni 1970 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich an der Ruhr-Universität Bochum das Studium der Chemie, wurde dann im April 1971 zum Wehr-, später zum Ersatzdienst eingezogen.

In den Jahren 1972 bis 1978 studierte ich die Fächer Biologie und Chemie an der Ruhr-Universität Bochum. Nach dem Vordiplom in Biologie und der Zwischenprüfung in Chemie legte ich im Februar 1978 meine mündliche Diplomprüfung im Fach Biologie ab. Von März bis September 1978 fertigte ich am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen meine experimentelle Diplom-Arbeit mit dem Titel "Photophosphorylierung in Lyophilisierten Chloroplasten" an.

Seit Oktober 1978 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. A. Trebst.